

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Estudos de Síntese e Complexação com Metais de Agentes Quelantes Potencialmente Biodegradáveis

Tese de Mestrado

desenvolvida no âmbito da disciplina de

Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Académico

Mónica Sofia Freitas dos Santos



Departamento de Engenharia Química

Orientador na FEUP: **Doutora Helena Maria Vieira Monteiro Soares**
Co-Orientador na FCT-UNL: **Doutora Maria Teresa Barros da Silva**

Julho de 2008

Agradecimentos

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

Em primeiro lugar agradeço à Doutora Helena Soares a sua orientação, ajuda, os conhecimentos que me transmitiu, a sua disponibilidade, paciência e simpatia demonstradas...Muito Obrigada por tudo.

À Doutora Maria Teresa Barros pela sua receptividade, simpatia, atenção e orientação.

Um agradecimento especial ao Professor Maycock pela sua receptividade, ajuda e apoio, pela sua disponibilidade constante e por tudo o que me ensinou sobre síntese orgânica.

À Doutora Carina por toda a ajuda, paciência e dedicação demonstradas aquando da minha integração no laboratório.

Aos restantes elementos do Lab.E302b, Eng. Cristina Alves, Eng. Manuela, Dr. João e Doutora Júlia, obrigada pelo apoio, simpatia, ajuda e incentivo demonstrados.

A todos os colegas do ITQB, em especial à Paula Rodrigues e Eva Lourenço, um sincero obrigada pela receptividade, disponibilidade, paciência e ajuda reveladas.

Ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, REQUIMTE e Universidade Nova de Lisboa pelas facilidades em termos de equipamento e financiamento.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo financiamento das deslocações Lisboa-Porto e estadia na Estação Agronómica Nacional.

Por fim, um Obrigada muito especial aos meus pais e irmão pelo apoio, carinho, compreensão, incentivo, dedicação...

Resumo

A emissão de efluentes com agentes quelantes não biodegradáveis, para o meio ambiente, é um facto e está a desencadear uma série de atitudes, cujo objectivo central é a substituição destes, por outros que sejam biodegradáveis. Os ligandos não biodegradáveis podem conduzir à remobilização de metais pesados, que se encontram depositados nos sedimentos e portanto, contribuir para a exposição do Homem a estes elementos.

A presente tese visa dar um contributo nesta área de intervenção apresentando estratégias de síntese de compostos precursores de dois ligandos potencialmente biodegradáveis e dando continuidade aos estudos de complexação da Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína com metais ainda não estudados (cálcio e cobre).

Dos estudos de complexação efectuados entre a Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína e o cálcio ou cobre concluiu-se que este ligando forma complexos do tipo ML e MHL para ambos os sistemas. No caso do sistema Ca^{2+} -Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína-OH, forma-se também o complexo ML_2 . As constantes de estabilidade obtidas para o sistema Ca^{2+} -Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína-OH foram as seguintes: $\log_{10}\beta_{\text{CaHL}} = 14.53 \pm 0.03$, $\log_{10}\beta_{\text{CaL}} = 4.79 \pm 0.01$ e $\log_{10}\beta_{\text{CaL}_2} = 8.38 \pm 0.04$. Para o sistema Cu^{2+} -Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína-OH, os valores das constantes de estabilidade obtidos foram: $\log_{10}\beta_{\text{CuHL}} = 31.19 \pm 0.02$ e $\log_{10}\beta_{\text{CuL}} = 27.02 \pm 0.06$.

Relativamente aos estudos de síntese, promoveram-se alterações na etapa de produção do (S)-etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo), nomeadamente a redução da quantidade de cloreto de oxalílico para metade, e implementaram-se novas etapas para a produção do (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo) e do (S)- etano -1,2bis (2-amino-3-ciano propanoato de benzilo).

Palavras Chave (Tema):

agentes quelantes, biodegradabilidade, síntese química, constantes de estabilidade.

Abstract

The emission of effluents containing non biodegradable chelating agents into the environment is a great matter concern. This fact has been a driving force of several attitudes with the aim to replace these non-biodegradable ligands by biodegradable ones.

The presence of these non biodegradable chelating agents in the aquatic systems can remobilize heavy metals present in the sediments and thus increases the amount of soluble heavy metals in the column of water.

The present thesis seeks to give a contribution in this area of intervention. For this purpose, strategies of synthesis of percursor compounds of two ligands potentially biodegradable are presented. In addition, complexation studies between N,N'-ethylenedi-L-cysteine and two metals (calcium and copper) not yet studied were performed.

The interaction of N,N'-ethylenedi-L-cysteine with calcium or copper evidenced the formation of species MHL and ML for both systems. In the case of Ca^{2+} -N,N'-ethylenedi-L-cysteine, the species ML_2 was also detected. For the Ca^{2+} -N,N'-ethylenedi-L-cysteine-(OH) system, the final model includes the following species: CaHL, CaL and CaL_2 , with stability constants values as $\log\beta$ of 14.53 ± 0.03 , 4.79 ± 0.01 and 8.38 ± 0.04 , respectively. For Cu^{2+} -N,N'-ethylenedi-L-cysteine-(OH) system the major species are CuHL and CuL with overall stability constants values of 31.19 ± 0.02 and 27.02 ± 0.06 , respectively.

Relatively to the studies of synthesis, modifications related with the reduction of the quantity of oxalilic chloride in the step of production of 1,2bis-(Benzyl 2-S-2-amino-3- cyano propanoate) oxalylamide were performed. New steps for the production of 1,2bis(Benzyl 2-S-2-amino 3- cyano propanoate) dithionooxalylamide and di-[2(S)-(Benzyl 2-amino-3-cyanopropanoate)]dithionooxalylamide were implemented.

Índice

Índice	i
Índice de Figuras	ii
Índice de Tabelas	vi
Índice de Esquemas	vii
Notação e Glossário	viii
1 Introdução.....	1
1.1 Enquadramento e Apresentação do Projecto	1
1.2 Contributos do Trabalho	1
1.3 Organização da Tese	2
2 Estado da Arte	3
3 Estudos de Complexação	7
3.1 Materiais e Métodos	7
3.2 Tratamento de Dados	9
3.3 Apresentação e Discussão dos Resultados	11
3.3.1 Cálculo	12
3.3.2 Cobre	17
3.3.3 Constantes de Formação Condicionais	21
4 Estudos de Síntese	24
4.1 Aspectos Experimentais	24
4.1.1 Purificação de Solventes e Reagentes	24
4.1.2 Equipamento e Condições Gerais	24
4.1.3 Descrição Experimental	25
4.2 Apresentação e Discussão de Resultados	31
5 Conclusões Gerais	39
6 Avaliação do Trabalho	40
6.1 Objectivos Realizados	40
6.2 Limitações e Trabalho Futuro	40
6.3 Apreciação Final	40
7 Bibliografia	41
Anexo A- Espectros dos Compostos Sintetizados.....	45

Índice de Figuras

- Figura 1-** Estrutura molecular de ligandos potencialmente biodegradáveis: (a) Ácido etileno diamino bis(4-aminobutanóico), (b) Etileno diamino asparagina e (c) Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína. **6**
- Figura 2-** Representação gráfica do Z_M em função do pA dos Modelos II e III para a titulação de razão $[L_T]:[Ca_T] = 4$, $[Ca^{2+}] = 1 \times 10^{-3} M$ **15**
- Figura 3-** Diagrama de distribuição das espécies do sistema Ca^{2+} —Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína—OH para o modelo CaHL, CaL e CaL_2 com $\log \beta$ iguais a 14.53, 4.79 e 8.38, respectivamente. A. $[L_T]:[Ca_T] = 1$, $[Ca^{2+}] = 1 \times 10^{-3} M$, a linha vertical a cheio indica o início de precipitação. B. $[L_T]:[Ca_T] = 4$, $[Ca^{2+}] = 1 \times 10^{-3} M$ **16**
- Figura 4-** Representação da função gráfica Z_M em função do pA para os Modelos I e II da Tabela 3. **18**
- Figura 5-** Diagrama de distribuição de espécies para $[L_T]:[Cu_T] = 1$, $[Cu^{2+}] = 1 \times 10^{-3} M$. As espécies consideradas no modelo foram CuHL, CuL e CuL(OH) com os valores de constantes de estabilidade seguintes ($\log \beta$): 21.01, 27.7, 33.8, respectivamente. **19**
- Figura 6-** Diagrama de distribuição das espécies para o sistema Cu^{2+} —Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína—OH, $[L_T]:[Cu_T] = 1$ e $[Cu^{2+}] = 1 \times 10^{-3} M$. O modelo considerado inclui as espécies CuHL e CuL com constantes de estabilidade ($\log \beta$) de 31.19 e 27.02, respectivamente. **20**
- Figura 7-** Representação gráfica do logaritmo das constantes condicionais entre o EDTA ou a Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína e o Cu^{2+} (A) ou o Ca^{2+} (B) em função do pH. **23**
- Figura A 1-** Espectro de 1H -RMN para o (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo. **46**
- Figura A 2-** Espectro de ^{13}C -RMN para o (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo. **46**

Figura A 3- Espectro de infravermelho para o (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo.	47
Figura A 4- Espectro HMQC para o (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo.	48
Figura A 5- Espectro COSY para o (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo.	49
Figura A 6- Espectro COSY a três dimensões para o (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo.	50
Figura A 7- Espectro de ^1H -RMN para o (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato benzilo.	51
Figura A 8- Espectro de ^{13}C -RMN para o (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato benzilo.	51
Figura A 9- Espectro de Infravermelho para o (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato benzilo.	52
Figura A 10- Espectro HMQC para o (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato benzilo.	53
Figura A 11- Espectro COSY para o (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato benzilo.	54
Figura A 12- Espectro de ^1H -RMN para o hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo.	55
Figura A 13- Ampliação do <i>dd dd</i> do espectro de ^1H -RMN para o hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo.	55

Figura A 14- Espectro de ^{13}C -RMN para o hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo.	56
Figura A 15- Espectro de Infravermelho para o hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo.....	57
Figura A 16- Espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).	58
Figura A 17- Ampliação do <i>dd dd</i> do espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).....	58
Figura A 18- Ampliação do <i>tt</i> do espectro de ^1H -RMN para (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).	59
Figura A 19- Ampliação do <i>d</i> do espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).	59
Figura A 20- Espectro de ^{13}C -RMN para o (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).	60
Figura A 21- Espectro de Infravermelho para o (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).	61
Figura A 22- Espectro de HMQC para o (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).	62
Figura A 23- Espectro de HMQC para o (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).	63
Figura A 24- Espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).	64

Figura A 25- Ampliação do <i>dd dd</i> do espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).....	64
Figura A 26- Ampliação do <i>d</i> do espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).....	65
Figura A 27- Ampliação do <i>m</i> do espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).....	65
Figura A 28- Espectro de ^{13}C -RMN para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).	66
Figura A 29- Espectro de Infravermelho para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).	67
Figura A 30- Espectro HMQC para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).	68
Figura A 31- Espectro COSY para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).	69

Índice de Tabelas

Tabela 1- Constante de dissociação da água, constantes de protonação do ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína (EC) e constantes de estabilidade dos complexos $M_x(OH)_y$, a 25°C. **11**

Tabela 2- Constantes de estabilidade para o sistema Ca^{2+} —Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína—OH determinadas por potenciometria com eléctrodo de vidro, a 25 °C e $I=0.1$ M, a partir de titulações de razão $[L_T]:[Ca_T] = 0.5, 1$ e 4 , com $[Ca^{2+}]=1\times 10^{-3}M$ **14**

Tabela 3- Constantes de estabilidade para o sistema Cu^{2+} - Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína-OH determinadas por potenciometria com eléctrodo de vidro, a 25 °C e $I=0.1$ M, a partir de uma titulação da razão $[L_T]:[Cu_T] = 1$, com $[Cu^{2+}]=1\times 10^{-3}M$ **18**

Índice de Esquemas

Esquema 1- Síntese do di-[2(S)-(2- amino-3-ciano propanoato de benzilo)]-ditionooxalilamida. Reagentes e condições reaccionais: (i) BnBr (1.3 eq.), TEA (1.5 eq.), THF, Δ , 2h 30min; (ii) TsCl (2.25 eq.), Pyr (5.3 eq.), DCM, 0-5°C, 48h; (iii) TFA (20.0 eq.), H ₂ O (14.24 eq.), CH ₃ CN, t.a., 6 h; (iv) C ₂ Cl ₂ O ₂ (0.5 eq.), TEA (2.0 eq.), DCM, 0-5°C, 32h; (v) THF (34 mL), Reagente de Lawesson (0.5 eq.), Δ , 24h; (vi) Etanol absoluto (2 mL), Raney Nickel em excesso (6 colheres pequenas), t.a, 8h.	33
Esquema 2- Mecanismo reaccional envolvido na esterificação do ácido carboxílico por benzilação.....	34
Esquema 3- Mecanismo reaccional envolvido na desidratação da amida.	34
Esquema 4- Mecanismo de adição do cloreto oxalílico ao hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo.....	36
Esquema 5- Mecanismo reaccional da tionação com o reagente de Lawesson.	38

Notação e Glossário

$[H_T]$	Concentração total de protão	M
$[L_T]$	Concentração total de ligando	M
$[M_T]$	Concentração total de metal	M
$[OH^-]$	Concentração de ião hidróxido	M
E^0	Intercepção do eléctrodo	
E_n^{calc}	Potencial calculado do eléctrodo	mV
E_n^{obs}	Potencial observado do eléctrodo no ponto experimental	mV
I	Força iónica	M
J	Constante de acoplamento	Hz
k	Declive de calibração do eléctrodo	
$K_{aparente}$	Constante de estabilidade	
K_{cond}	Constante de formação condicional	
N	Número total de pontos experimentais	
n_p	Número de prâmetros otimizados simultâneamente	
R^H	Parâmetro R Hamilton	
U	Função objectivo a minimizar	
Z_H	Função de protão	
Z_M	Função de formação do metal	

Letras gregas

δ	Desvio químico
Δ	Sob refluxo
ν_{max}	Frequência máxima de absorção

Lista de Siglas

BnBr	Brometo de benzilo
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
c.c.f	Cromatografia de camada fina
Ca^{2+}	Cálcio
COSY	Correlated Spectroscopy
^{13}C -RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
Cu^{2+}	Cobre
d	Dubleto
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dubleto
DTPA	Ácido dietilenotetraminopentacético
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eq.	Equivalentes molares
ESTA	Equilibrium Simulation for Titration Analysis
HEDTA	Ácido N- hidroxietil- etileno diaminatriacético
HMQC	Hetronuclear Multiple Quantum Correlation
1H -RMN	Ressonância magnética nuclear de protão
IV	Infravermelho

<i>m</i>	Múltiplo
NTA	Ácido nitrilotriacético
PDTA	Ácido 1,3-propilenodiaminapentacético
PLC	Cromatografia em camada fina preparativa
Pyr	Piridina
<i>s</i>	Singuleto
t.a.	Temperatura ambiente
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TsCl	Cloreto de tosilato

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projecto

A utilização de ligandos não biodegradáveis por parte de várias indústrias (detergentes, lacticínios, têxtil...) e sector agrícola tem sido motivo de grande preocupação ambiental, na medida em que estes compostos podem ser os responsáveis pela remobilização de metais pesados. Neste sentido, têm surgido incentivos para a pesquisa de novos ligandos, com poder quelante equivalente aos tradicionalmente usados e com a vantagem de serem potencialmente biodegradáveis.

A presente tese foi desenvolvida no âmbito do projecto intitulado “Novos agentes quelantes potencialmente biodegradáveis para aplicações industriais e domésticas ambientalmente amigáveis” (projecto POCI/QUI/57891/2004), financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia. Assim, o principal objectivo consiste na produção de agentes quelantes “verdes” de elevada pureza capazes de substituir os ligandos quelantes poluentes, produzidos actualmente. Para este fim, aposta-se na síntese de ácidos aminopolicarboxílicos naturais ou seus derivados que sejam biodegradáveis, apresentem baixa toxicidade e elevada afinidade para os metais.

1.2 Contributos do Trabalho

O trabalho descrito apresenta um carácter inovador dado que, perante a gravidade ambiental decorrente da utilização excessiva de ligandos não-biodegradáveis, visa contribuir para a síntese de novos ligandos “amigos” do ambiente. Assim, apresenta-se nesta dissertação uma estratégia sintética para a produção do di-[2(S)-(2- amino-3-ciano propanoato de benzilo)]-ditionooxalilamida a partir do aminoácido L-asparagina, protegido sob a forma de carbamato. Saliente-se que os passos de protecção dos grupos ácido carboxílico e amida da cadeia lateral da asparagina foram objecto de estudo de uma outra dissertação (Soares, 2007). Apesar dos passos de desprotecção da amina, que se encontra protegida sob a forma de carbamato, e de acoplamento de dois aminoácidos não serem novos, efectuaram-se alterações ao nível de condições reaccionais que melhoraram o rendimento de 12 %, que tinha sido obtido

anteriormente (Soares, 2007). Para além das alterações efectuadas, que conduziram a um rendimento superior, conseguiu-se traçar uma outra estratégia de produção do (S)-etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo a partir do (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato benzilo. Apesar deste método alternativo conduzir a bons resultados deve ser estudado mais a pormenor, para que se possam introduzir alterações que conduzam a uma maior velocidade da reacção. Os passos correspondentes à tionação com reagente de Lawesson's e à reacção com catalisador raney nickel são totalmente novos.

Por outro lado e por forma a maximizar o número de alternativas disponíveis aos ligandos tradicionalmente comercializados, este trabalho dá continuidade aos estudos de complexação para o ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína. Assim, apresentam-se estudos de interacção do ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína com dois metais pesados (cálcio e cobre).

1.3 Organização da Tese

A tese está estruturada em seis capítulos. No primeiro capítulo, faz-se uma breve apresentação do tema salientando-se o valor acrescentado do mesmo. O segundo capítulo contém uma introdução geral ao tema, sendo referidos todos os estudos que já foram realizados nesse âmbito. A terceira e quarta partes correspondem aos estudos de complexação entre os metais, cálcio ou cobre, com o ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína e aos estudos de síntese de compostos precursores, de dois ligandos potencialmente biodegradáveis, respectivamente. O quinto capítulo compila as conclusões gerais e o sexto faz referência à forma como o trabalho foi desenvolvido, sendo apresentada uma análise crítica e propondo-se alguns pontos de abordagem futuros.

2 Estado da Arte

A utilização de agentes quelantes, não biodegradáveis, tem sido abusiva e está a tornar-se preocupante.

Ligandos como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido dietilenotetraminopentacético (DTPA), ácido 1,3-propilenodiaminapentacético (PDPA) e ácido N- hidroxietil- etileno diaminatriacético (HEDTA) são largamente utilizados em diferentes ramos industriais: indústria dos detergentes, cosméticos, laticínios, pasta de papel, indústria fotográfica, têxtil, couro e metal (Schowanek *et al.*, 1997). Todos estes sectores industriais têm um problema comum que reside na ocorrência de reacções secundárias e danificação de unidades processuais, em resultado da presença de metais pesados. Perante este cenário, os agentes quelantes fortes apresentam-se como uma solução para este problema, na medida em que ao estabelecerem ligações coordenadas com os catiões metálicos, tornam-se solúveis em água e impedem a sua acção maléfica. Uma aplicação um pouco diferente mas, com o mesmo fundamento, é na agricultura. Neste caso, os ligandos são usados para complexar alguns metais indispensáveis às plantas tornando-os biodisponíveis (Jacobson, 1951). Mais recentemente, estes compostos têm sido usados como agentes complexantes em estudos de remediação de solos contaminados com metais (Vandevivere *et al.*, 2001; Leštan *et al.*, 2008).

Uma vez que estas aplicações se baseiam na solubilidade dos complexos ligando-metal em água, estes compostos acabam por ser rejeitados nas águas residuais, atingindo as estações de tratamento e, uma vez que não são biodegradáveis, após o tratamento dos efluentes acabam por atingir o meio ambiente. Aí devido ao seu elevado poder quelante, podem provocar a remobilização dos metais (por exemplo dos sedimentos) e desta forma, acentuar a exposição do Homem a estes elementos.

Apesar dos dados disponíveis para a produção, venda e aplicação de agentes complexantes serem incompletos sabe-se que, em 1999, usaram-se cerca de 34550 toneladas de EDTA na Europa (Knepper, 2003).

Os agentes complexantes que contêm na sua estrutura dois ou mais átomos de azoto terciários e quatro ou mais grupos carboximéticos, como substituintes (exemplo: EDTA, DTPA, HEDTA e PDPA) são muito estáveis do ponto de vista ambiental (Pitter e Sýkora, 2001;

Sýkora *et al.*, 2001). Só em casos muito especiais se observou uma lenta degradação aeróbia do EDTA (Belly *et al.*, 1975; Means *et al.*, 1980; Tiedje, 1975). O NTA, o qual contém um átomo de azoto na sua estrutura, é biodegradável mas, sob condições muito específicas (Knepper, 2003; Takahashi *et al.*, 1997). Apesar disso, este ligando é suspeito de indução de toxicidade renal e tumores quando a exposição é prolongada a doses elevadas (Polettini *et al.*, 2006).

Foram registadas concentrações de EDTA e DTPA superiores a 100µg/L em águas de rios (Dietz, 1987; Frimmel *et al.*, 1989; Pitter *et al.*, 1999), a 40µg/L nas águas para consumo humano (Dietz, 1987) e a 300µg/L nas águas residuais (Kari e Giger, 1996).

Num tratado germânico de 1991, varias entidades concordaram com a redução em 50% na quantidade de EDTA nas águas, até finais de 1996; esta meta foi parcialmente atingida ficando-se por uma redução na ordem dos 30-35% de EDTA nas águas (Knepper, 2003).

As crescentes preocupações ambientais adjacentes a este facto fomentaram a procura de ligandos, que possuam uma capacidade quelante semelhante aos ligandos frequentemente usados, mas com a vantagem de serem biodegradáveis.

Os ácidos aminopolicarboxílicos possuem pelo menos um átomo de azoto terciário na posição central da molécula, aos quais se encontram associados resíduos alquílicos e grupos acídicos ligados a estes últimos. Assim, o rearranjo espacial destes ligandos com grupos funcionais detentores de átomos dadores de electrões leva à formação de quelatos de estequiometria 1:1. Em regra, estes quelatos são formados por vários anéis de cinco e/ou seis lados em torno do ião metálico.

A análise da estrutura do ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína mostra que este apresenta seis grupos funcionais contendo átomos dadores de electrões (duas aminas secundárias, dois grupos carboxílicos e dois grupos tiol). Potencialmente, este ligando poderá formar até seis anéis em torno do ião metálico central.

Estudos recentes (Ritter e Sykora, 2001) mostraram que derivados dissustituídos contendo duas aminas secundárias, como é o caso do ácido etilenodiamina diacético (EDDA), são potencialmente biodegradáveis (Pitter e Sykora, 2001). Por outro lado, ligandos como Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína (Figura 1), Ácido etileno diamino bis(4-aminobutanóico) (Figura 1) e Etileno diamino asparagina (Figura 1), para além de serem derivados dissustituídos contendo duas aminas secundárias, podem ser sintetizados a partir do aminoácido L correspondente, que é a forma isomérica mais abundante nos organismos vivos (O'Dowd e Hopkins, 1998). Todos estes aspectos apontam para que estes ligandos apresentem características estruturais para serem agentes quelantes “verdes”, os quais devem combinar uma série de propriedades: biodegradabilidade, baixa toxicidade e elevada afinidade para muitos metais.

Li *et al.* (1996) estudou as características ácido-base e a formação de complexos da Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína com alguns iões metálicos relacionados com o ambiente (cádmio, chumbo, cobalto, níquel e zinco) e biomedicina (índio e gálio) mas, não há dados na literatura para outros metais importantes, como é o caso do cálcio e cobre. Como a Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína possui características de um agente quelante potencialmente biodegradável, este trabalho deu continuidade à sua abordagem, apresentando estudos de complexação para os metais que ainda não foram objecto de análise.

À semelhança da Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína, tentou-se contribuir no estudo de síntese de dois novos ligandos potencialmente biodegradáveis [Ácido etileno diamino bis(4-aminobutanóico) (Figura 1) e Etileno diamino asparagina (Figura 1)], produzindo-se os seus compostos precursores a partir de unidades enanteoméricamente puras do aminoácido correspondente. Como já se mencionou anteriormente, este aspecto é uma garantia de uma potencial biodegradabilidade.

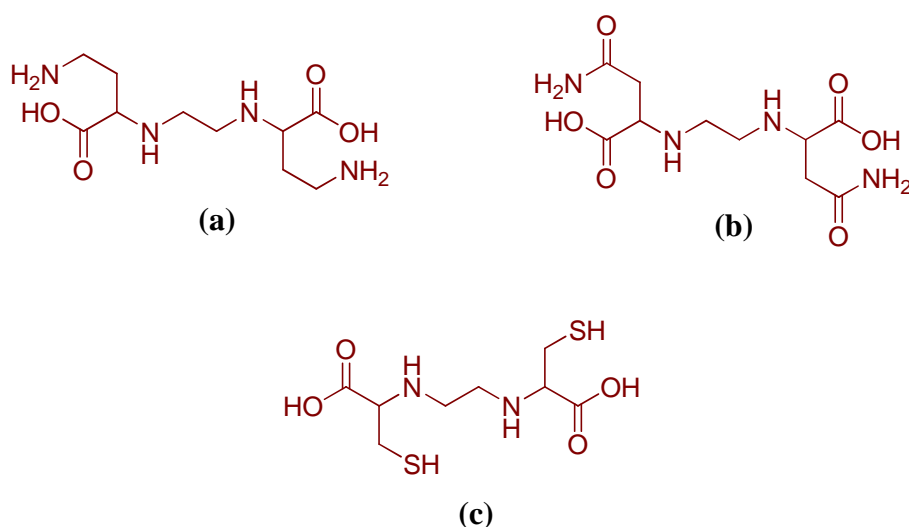


Figura 1- Estrutura molecular de ligandos potencialmente biodegradáveis: **(a)** Ácido etileno diamino bis(4-aminobutanóico), **(b)** Etileno diamino asparagina e **(c)** Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína.

Neste contexto, pretendeu-se com a presente tese contribuir para o estudo da síntese de novos ligandos, da família dos ácidos aminopolicarboxílicos, apresentando-se estudos de síntese para a obtenção de novos agentes quelantes, que tudo indica apresentarem carácter biodegradável. É ainda objectivo, avaliar o poder quelante de um outro ligando, já sintetizado laboratorialmente (Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína), também potencialmente biodegradável.

3 Estudos de Complexação

3.1 Materiais e Métodos

Todo o material utilizado foi previamente descontaminado, permanecendo doze horas numa solução de ácido nítrico (HNO_3) 0.5M, e passado várias vezes com água desionizada, com resistividade $> 4\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$. Nas experiências efectuadas, recorreu-se apenas a água desionizada com as características mencionadas.

Preparou-se uma solução de hidróxido de potássio (KOH) de cerca de 0.1M, dissolvendo-se o KOH sólido da marca Fluka em água desionizada. A solução foi titulada com o padrão primário de hidrogenoftalato de potássio sendo, o ponto de equivalência determinado pelo método de Gran (Rossotti e Rossotti, 1965). Este método permite também verificar se a base forte se encontra contaminada com carbonato.

A descarbonatação da base foi efectuada de acordo com Albert e Serjeant (1962).

Preparou-se ainda, uma solução de ácido clorídrico (HCl), de concentração aproximada de 0.1 M, a partir de ácido concentrado (Merck) e titulou-se com o padrão secundário de KOH.

A calibração do eléctrodo de vidro, em termos da $[\text{H}^+]$, foi realizada por adição da solução padrão de KOH à solução de HCl padronizada. Saliente-se o facto de que a força iónica foi ajustada a 0.1 M, em ambas as soluções. A partir desta titulação potenciométrica, a ordenada na origem (E°) e o declive da resposta, obtidos através do ajuste de uma recta aos pontos experimentais na gama de pH entre 2 e 11, foram usados para calcular o pH das amostras durante as titulações.

As titulações potenciométricas foram executadas num sistema, controlado por computador, constituído por um decimilivoltímetro de marca Crison modelo 2002 e uma bureta automática da marca Crison modelo MicroBU 2030. A aquisição automática dos dados foi feita através do programa COPOTISY. As leituras da $[\text{H}^+]$ foram efectuadas através do recurso a um eléctrodo de vidro Philips GAH 110 e um eléctrodo de referência Orion 90-02-00 de dupla junção, com a parte externa cheia de cloreto de potássio (KCl) 0.1 M.

Todas as experiências foram efectuadas a força iónica ajustada a 0.1 M KCl, numa célula de vidro da marca Metrohm, com agitação (agitador magnético da marca Merck) e termostatizada a 25.0 ± 0.1 °C. O KCl usado como electrólito, para manter constante a força iónica das amostras, foi fornecido pela Merck.

Por forma a remover o oxigénio e o dióxido de carbono dissolvidos nas soluções promoveu-se o desarejamento do sistema de potenciometria, com um fluxo constante de azoto de elevada pureza (grau de pureza ≥ 99.999 %).

As constantes de estabilidade do ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína deste com os iões cálcio (Ca^{2+}) e cobre (Cu^{2+}) foram determinadas por titulações potenciométricas directas. Para ambos os sistemas considerados, adicionou-se à solução constituída por uma quantidade rigorosa de ligando, metal e ácido, um volume de KOH padrão. Após ter-se atingido o equilíbrio, o potencial observado foi registado automaticamente em função do volume de KOH padrão adicionado.

Para quantificar as constantes de estabilidade do sistema Ca^{2+} – Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína foram estudadas razões $[\text{L}]/[\text{Ca}^{2+}]$ de 1:2, 1:1 e 4:1, com concentração de Ca^{2+} igual a 1×10^{-3} M. A refinação final dos resultados foi feita a um conjunto total de 496 pontos, na gama de pH entre 8.0 e 10.5, a partir de um conjunto de 13 titulações potenciométricas preparadas a partir de 7 soluções independentes.

Quanto ao sistema Cu^{2+} – Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína, as constantes de estabilidade foram quantificadas usando a razão $[\text{L}]/[\text{M}]$ de 1:1, com concentração de Cu^{2+} 1×10^{-3} M. Na operação global de refinação usaram-se 633 pontos na gama de pH entre 2.2 e 4.0, colhidos a partir de um total de 9 titulações potenciométricas preparadas a partir de 6 soluções independentes.

3.2 Tratamento de Dados

Os procedimentos de simulação e optimização, dos resultados obtidos na potenciometria, foram efectuados com o programa “Equilibrium Simulation for Titration Analysis” (ESTA) (May *et al.*, 1985; May *et al.*, 1988). Estas operações de refinação envolvem a resolução de equações de balanço material para o metal e para o ligando e de balanço de protões, de tal modo que a $[H^+]$ obtida por esta última equação, quando transformada em potencial pela curva de calibração do eléctrodo, reproduz o valor experimental do potencial observado em cada ponto experimental. Assim, este algoritmo visa minimizar a função objectivo, U , definida como:

$$U = (N - n_p)^{-1} \sum_{n=1}^N (E_n^{obs} - E_n^{calc})^2 \quad (3.1)$$

em que U é a função objectivo a minimizar, N é o número total de pontos experimentais, n_p representa o número de parâmetros optimizados simultaneamente, E_n^{obs} o potencial observado do eléctrodo no ponto experimental n e E_n^{calc} o potencial calculado do eléctrodo.

O algoritmo usado pelo ESTA, na minimização do parâmetro U é o método de Gauss-Newton.

Por sua vez, o potencial calculado do eléctrodo é dado por:

$$E_n^{calc} = E^0 + k \log[H^+] \quad (3.2)$$

Onde E^0 corresponde à intercepção do eléctrodo e k é o declive da calibração do mesmo.

O parâmetro R Hamilton, R^H , é um parâmetro estatístico usado pelo ESTA, e reflecte a aproximação dos valores determinados pelo algoritmo aos pontos obtidos experimentalmente. Este parâmetro é calculado através da expressão seguinte:

$$R^H = \left[\frac{U}{\sum_{n=1}^N (E_n^{obs})^2} \right]^{1/2} \quad R^H \text{ não tem dimensões} \quad (3.3)$$

O software ESTA inclui ainda, duas funções gráficas (Marsicano *et al.*, 1988): (i) uma função de protão, Z_H , e uma função de formação de metal, Z_M . A função Z_M usada nesta tese é calculada através da equação seguinte:

$$Z_M = \frac{[L_T] - L \left(1 + \sum_{n=1}^N \beta_{n01} [H^+]^n \right)}{[M_T]} \quad (3.4)$$

onde,

$$L = \frac{[H_T] - [H^+] + [OH^-]}{\sum_{n=1}^N \beta_{n01} [H^+]^n} \quad (3.5)$$

$[L_T]$, $[M_T]$ e $[H_T]$ representam a concentração total de ligando, metal e protão, respectivamente; β_{n01} indicam as constantes de formação das espécies $M_nL_1H_0$. A função Z_M é determinada em cada ponto e é representada graficamente em função de $-\log[L]$, ou seja pA, para ajudar nos procedimentos de modelização.

Note-se que inicialmente é necessário investigar todos os modelos $M-(L)_X-(OH)_Y$ possíveis e gerar as funções Z_M de forma a seleccionar o que se adequa mais à situação. Esta etapa de selecção, para além da análise química do sistema em estudo, tem em consideração o ajuste da função teórica aos pontos experimentais.

Durante as operações de refinação dos dois sistemas metal- Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína estudados, as constantes de protonação da água (Smith e Martell, 2004) e de

protonação do ligando (Li *et al.*, 1996), bem como todas as constantes de formação das espécies, $M_x(OH)_y$ (Smith e Martell, 2004), foram mantidas constantes (Tabela 1).

Tabela 1- Constante de dissociação da água, constantes de protonação do ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína (EC) e constantes de estabilidade dos complexos $M_x(OH)_y$, a 25°C.

	Equilíbrio	Log β	I (M)	Referência
Água	$H^+ + OH^- \leftrightarrow H_2O$	13.78	0.1	(Smith e Martell, 2004)
EC	$L^- + H^+ \leftrightarrow HL$	11.14	0.1	(Li <i>et al.</i> , 1996)
	$L^- + 2H^+ \leftrightarrow H_2L$	21.02	0.1	(Li <i>et al.</i> , 1996)
	$L^- + 3H^+ \leftrightarrow H_3L$	28.93	0.1	(Li <i>et al.</i> , 1996)
	$L^- + 4H^+ \leftrightarrow H_4L$	34.33	0.1	(Li <i>et al.</i> , 1996)
	$L^- + 5H^+ \leftrightarrow H_5L$	36.03	0.1	(Li <i>et al.</i> , 1996)
Cálcio	$Ca^{2+} + OH^- \leftrightarrow Ca(OH)^+$	0.96	0.1	(Smith e Martell, 2004)
	$Ca(OH)_2 (s) \leftrightarrow Ca^{2+} + 2 OH^-$	-5.29	0.0	(Smith e Martell, 2004)
Cobre	$Cu^{2+} + OH^- \leftrightarrow Cu(OH)^+$	6.1	0.1	(Smith e Martell, 2004)
	$2Cu^{2+} + OH^- \leftrightarrow Cu_2(OH)^{3+}$	8.4	3.0	(Smith e Martell, 2004)
	$2Cu^{2+} + 2OH^- \leftrightarrow Cu_2(OH)_2^{2+}$	16.8	0.1	(Smith e Martell, 2004)
	$3Cu^{2+} + 4OH^- \leftrightarrow Cu_3(OH)_4^{2+}$	33.7	0.1	(Smith e Martell, 2004)
	$Cu(OH)_2 (s) \leftrightarrow Cu^{2+} + 2 OH^-$	-18.7	0.0	(Smith e Martell, 2004)

Por forma a simplificar o texto, as cargas dos hidroxocomplexos dos metais e dos complexos formados entre os metais e o ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína serão omitidas, ao longo do texto seguinte.

3.3 Apresentação e Discussão dos Resultados

Os estudos de complexação dos sistemas metal (cálcio ou cobre) com o ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína foram realizados por potenciometria com eléctrodo de vidro. Para analisar os dados obtidos, começou-se por traçar as curvas de Z_H em função do pH (dados não mostrados). A função Z_H permite evidenciar a gama de pH a partir da qual começa a ocorrer complexação. Isto é facilmente verificado quando o

valor do Z_H , de uma titulação ligando-metal, começa a divergir do valor do Z_H obtido, nas mesmas circunstâncias, para a respectiva titulação só com o ligando.

A análise comparativa da função Z_H para os dois metais estudados (cálcio e cobre) evidenciou que a complexação entre o ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína inicia-se em condições muito ácidas para o cobre e em condições ligeiramente alcalinas para o cálcio.

3.3.1 Cálcio

Para o cálcio, os estudos de complexação do sistema Ca^{2+} —Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína—OH foram realizados recorrendo a três razões entre a concentração total do ligando e a concentração total do metal ($[\text{L}_T]:[\text{M}_T]$) de 0.5, 1 e 4, com concentração de metal $1 \times 10^{-3}\text{M}$. A função Z_H evidenciou que a formação dos complexos começa a ocorrer por volta de pH 8 (dados não mostrados). Tendo em consideração que a pH superior a 8.0, o ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína encontra-se nas formas protonadas (H_2L e HL) e na forma desprotonada (L) consideraram-se, para as operações de refinação do Ca^{2+} , as espécies CaHL , CaL e CaL_2 . A espécie CaLOH não foi incluída na refinação uma vez que a hidrólise do Ca^{2+} só começa a ser significativa a valores de pH elevados (pH 12.0).

Para este metal, consideraram-se três modelos [**Modelo I**: CaL ; **Modelo II**: CaHL e CaL ; **Modelo III**: CaHL , CaL e CaL_2] na refinação do sistema Ca^{2+} -L-OH, na gama de pH entre 7.5 e 10.5.

Para as razões $[\text{L}_T]:[\text{Ca}_T]$ de 0.5 e 1, considerou-se apenas os Modelos I e II (Tabela 2) na refinação. Para as razões $[\text{L}_T]:[\text{Ca}_T]$ de 1 e 4, todos os modelos foram considerados no processo de refinação (Tabela 2). Pela análise da tabela constata-se que:

- (i) para todas as razões $[\text{L}_T]:[\text{Ca}_T]$, não há diferenças significativas no valor da constante de estabilidade da espécie CaHL , refinada a partir dos Modelos II e III;
- (ii) para as razões $[\text{L}_T]:[\text{Ca}_T]$ de 0.5 e 1, o valor da constante de estabilidade da espécie CaL varia significativamente quando se refina os Modelos I e II; pelo contrário, os valores refinados para a razão $[\text{L}_T]:[\text{Ca}_T]$ de 4 pelos

Modelos II e III não conduzem a diferenças significativas do valor da constante de estabilidade;

- (iii) na razão $[L_T]:[Ca_T]$ de 1, todas as tentativas de refinação do Modelo III conduziram à rejeição da espécie CaL_2 ;
- (iv) para as razões $[L_T]:[Ca_T]$ de 0.5 e 1, o Modelo II reproduz melhor os resultados experimentais que o Modelo I, uma vez que conduz a menores valores do parâmetro estatístico R ; pelo contrário, para a razão $[L_T]:[Ca_T]$ de 4 o melhor ajuste é obtido com o Modelo III (Tabela 2 e Figura 2).

Estes resultados sugerem que o modelo final deve incluir $CaHL$, CaL e CaL_2 . De facto, a análise da função Z_M , para a razão $[L_T]:[Ca_T]$ de 4 e para o Modelo II, mostra que para valores de pH elevados (valores baixos de $-\text{Log}[L]$), a função Z_M calculada está abaixo da função Z_M experimental, reflectindo a ausência de outra(s) espécie(s). Visto que a função cresce acima de 1, a espécie CaL_2 pode ser a peça chave para completar o modelo (Marsicano *et al.*, 1988). Como se pode ver na Figura 2, a inclusão do CaL_2 no modelo (Modelo III) conduziu a um bom ajuste aos pontos experimentais, observando-se um melhoramento no valor do factor-R Hamilton (Tabela 2).

Tabela 2- Constantes de estabilidade para o sistema Ca^{2+} —Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína—OH determinadas por potenciometria com eléctrodo de vidro, a 25 °C e $I=0.1$ M, a partir de titulações de razão $[\text{L}_\text{T}]:[\text{Ca}_\text{T}] = 0.5, 1$ e 4 , com $[\text{Ca}^{2+}]=1\times 10^{-3}\text{M}$.

	$[\text{L}_\text{T}]:[\text{Ca}_\text{T}]=0.5$		$[\text{L}_\text{T}]:[\text{Ca}_\text{T}]=1$		$[\text{L}_\text{T}]:[\text{Ca}_\text{T}]=4$		
Complexos	Modelo I	Modelo II	Modelo I	Modelo III / II	Modelo I	Modelo II	Modelo III
$\text{Ca}^{2+} + \text{HL} \leftrightarrow \text{CaHL}^{2+}$	NI	14.46 ± 0.03	NI	14.35 ± 0.02	NI	14.35 ± 0.03	14.45 ± 0.02
$\text{Ca}^{2+} + \text{L}^- \leftrightarrow \text{CaL}^+$	4.37 ± 0.05	4.54 ± 0.03	4.59 ± 0.04	4.75 ± 0.01	4.71 ± 0.04	5.01 ± 0.07	5.034 ± 0.009
$\text{Ca}^{2+} + 2\text{L}^- \leftrightarrow \text{CaL}_2$	NI	NI	NI	R	NI	NI	8.65 ± 0.01
Factor R-Hamilton	0.020	0.0072	0.020	0.0042	0.015	0.024	0.0028
Número de pontos usados na refinação	31	31	23	23	64	64	64

NI - Não Incluído na refinação.

R-Rejeitado

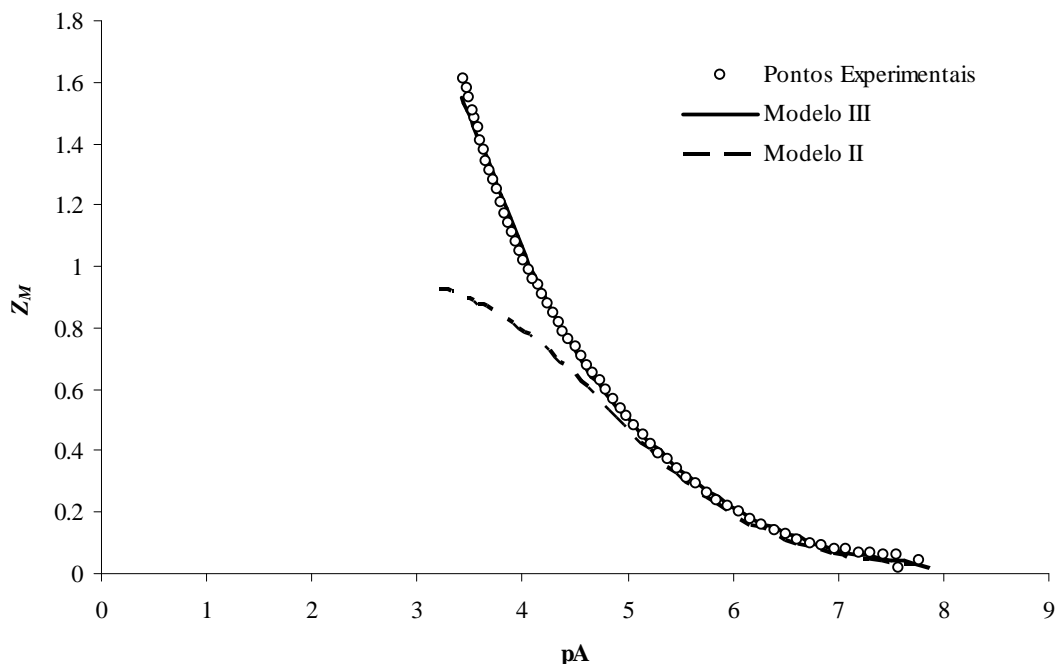


Figura 2- Representação gráfica do Z_M em função do pA dos Modelos II e III para a titulação de razão $[L_T]:[Ca_T] = 4$, $[Ca^{2+}] = 1 \times 10^{-3} M$.

Com o intuito de averiguar se o Modelo III é o modelo correcto, traçaram-se diagramas de distribuição de espécies para as razões $[L_T]:[Ca_T]$ de 1 e 4 (Figura 3).

Pela análise dos diagramas de distribuição de espécies (Figura 3) é claro que, para a razão $[L_T]:[Ca_T]$ de 1, as espécies $CaHL$ e CaL são as dominantes na gama de pH considerada na refinação. Até pH 10.5 não se forma quantidade significativa de CaL_2 , razão pela qual o ESTA rejeita esta espécie no Modelo III, para a razão $[L_T]:[Ca_T]$ de 1 (Tabela 2). Por outro lado, as três espécies ($CaHL$, CaL e CaL_2) formam-se em quantidade significativa para a razão $[L_T]:[Ca_T]$ de 4, na gama de pH entre 8.0 e 10.5; deste modo, o programa refina o Modelo III com um bom ajuste.

Depois deste exercício de modelização, considerou-se o modelo constituído pelas espécies $CaHL$, CaL e CaL_2 como modelo final. Assim, refinaram-se as constantes de estabilidade tendo em conta todos os resultados experimentais ($[L_T]:[Ca_T]$ de 0.5, 1 e 4); os valores finais obtidos são: $\log_{10}\beta_{CaHL}=14.53\pm0.03$, $\log_{10}\beta_{CaL}=4.79\pm0.01$ e $\log_{10}\beta_{CaL_2}=8.38\pm0.04$. Saliente-se que estes valores finais das constantes de estabilidade e respectivos erros associados a cada

constante de estabilidade foram determinados a partir de um total de 496 pontos provenientes de 13 titulações independentes, obtidas a partir de 7 soluções independentes.

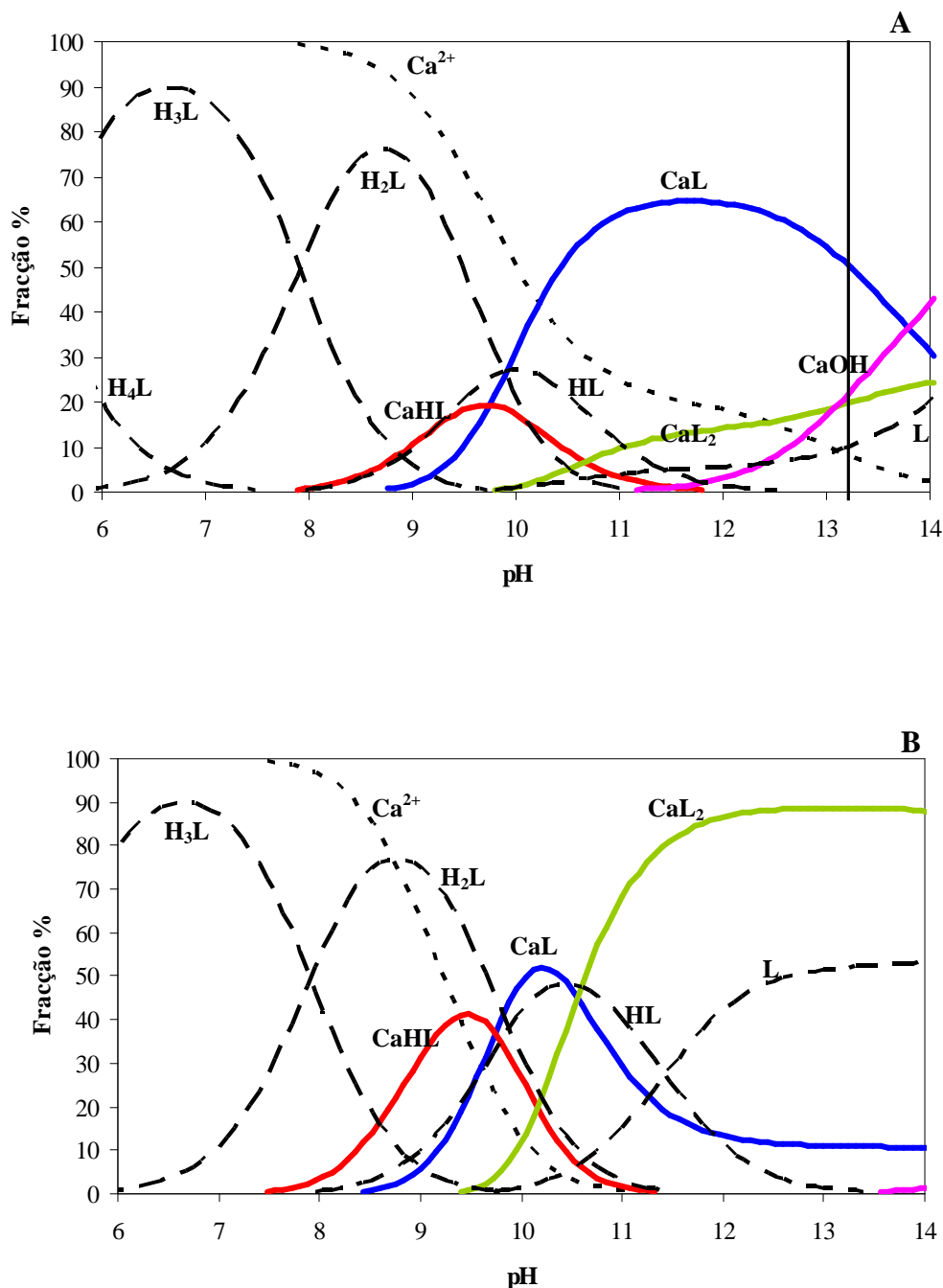


Figura 3- Diagrama de distribuição das espécies do sistema Ca^{2+} —Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína—OH para o modelo CaHL, CaL e CaL_2 com $\log \beta$ iguais a 14.53, 4.79 e 8.38, respectivamente. A. $[L_T]:[Ca_T] = 1$, $[Ca^{2+}] = 1 \times 10^{-3} M$, a linha vertical a cheio indica o início de precipitação. B. $[L_T]:[Ca_T] = 4$, $[Ca^{2+}] = 1 \times 10^{-3} M$.

3.3.2 Cobre

Uma vez que a complexação entre o ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína e o cobre começa a ocorrer a pH muito baixo, é expectável que possam formar-se complexos ácidos do tipo, CuH_xL . Para as operações de refinação do sistema Cu^{2+} — Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína —OH, começou-se por incluir as espécies CuH_2L , CuHL , CuL e $\text{CuL}(\text{OH})$ no processo de refinação. A tentativa de refinar todas as espécies, na gama de pH entre 2.0 e 11.0, não se revelou bem sucedida. Uma vez que a Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína forma complexos fortes com o cobre, decidiu-se refinar o sistema sem incluir as espécies $\text{CuL}_x(\text{OH})_y$ numa gama de pH mais apertada (entre pH 2.2 e 4.4). Assim, para o modelo constituído pelas espécies CuH_2L , CuHL e CuL , o ESTA rejeitou sempre a espécie CuH_2L em todas as titulações efectuadas. Em seguida, a refinação do modelo constituído pelas espécies CuHL e CuL conduziu a um valor muito pequeno do parâmetro estatístico R (Modelo I, Tabela 3). Apesar do bom ajuste obtido com o Modelo I, decidiu-se testar, na mesma gama de pH, o modelo constituído apenas pela espécie CuL (Modelo II, Tabela 3). A análise da Tabela 3 mostra que os valores da constante de estabilidade obtidos para CuL por ambos os modelos são equivalentes. No entanto, os valores do parâmetro estatístico R evidenciam um melhor ajuste entre os resultados experimentais e o modelo I (Tabela 3). Adicionalmente, a análise da função Z_M para o modelo II mostra uma clara compensação matemática entre a curva de complexação calculada e os pontos experimentais, em toda a gama de pH refinada (Figura 4). Para valores de pH mais elevados (valores de pA < 27.5), a função Z_M calculada encontra-se acima dos pontos experimentais, o que evidencia que o valor da constante para CuL foi refinado por excesso. Por outro lado, para valores de pH mais baixos (valores de pA > 27.5), a função Z_M calculada encontra-se abaixo dos pontos experimentais. Este facto evidencia a formação de outra espécie nesta gama de pH. Uma vez que valores de pA superiores a 27.5 correspondem a valores de pH inferiores a 2.6, a espécie em falta deverá corresponder a um complexo ácido do tipo CuHL .

Tendo em conta a discussão efectuada, o modelo constituído pelas espécies CuHL e CuL (Modelo I, Tabela 3) reproduz satisfatoriamente os resultados experimentais na gama de pH considerada. Por outro lado, a Figura 4 mostra que para valores de pH mais elevados (ou seja pA baixo) os valores de Z_M tendem para 1, o que indica que a esse pH tem-se praticamente 100% de formação de CuL .

Tabela 3- Constantes de estabilidade para o sistema Cu^{2+} - Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína-OH determinadas por potenciometria com eléctrodo de vidro, a 25 °C e $I=0.1$ M, a partir de uma titulação da razão $[\text{L}_\text{T}]:[\text{Cu}_\text{T}] = 1$, com $[\text{Cu}^{2+}]=1\times 10^{-3}\text{M}$.

Complexos	$[\text{L}_\text{T}]:[\text{Cu}_\text{T}]=1$	
	Modelo I	Modelo II
$\text{Cu}^{2+} + \text{HL} \leftrightarrow \text{CuHL}^{2+}$	31.01 ± 0.02	NI
$\text{Cu}^{2+} + \text{L}^- \leftrightarrow \text{CuL}^+$	27.73 ± 0.02	27.8 ± 0.1
$\text{Cu}^{2+} + 2\text{L}^- \leftrightarrow \text{CuL}_2$	NI	NI
Factor R-Hamilton	0.0022	0.024
Nº pontos	43	43

NI: Não Incluído

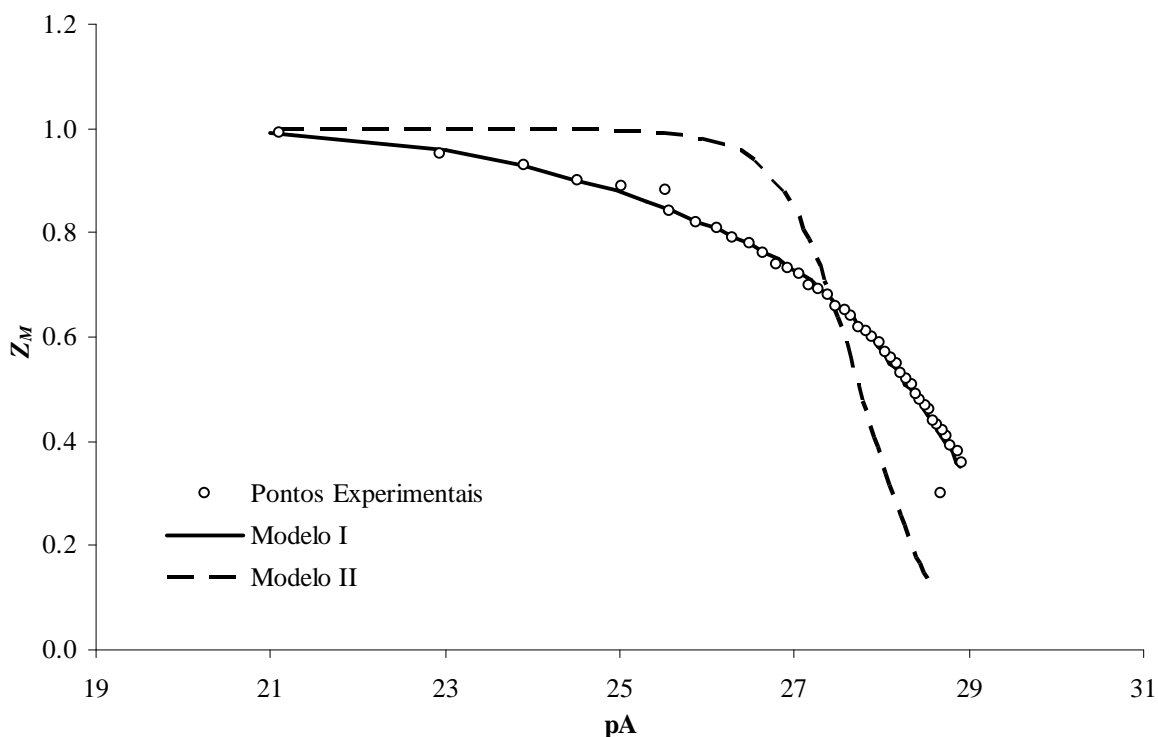


Figura 4- Representação da função gráfica Z_M em função do pA para os Modelos I e II da Tabela 3.

Uma vez que o catião Cobre (II), na ausência de agentes complexantes, tem tendência a sofrer hidrólise a pH próximo da neutralidade (dados não mostrados), decidiu-se efectuar um diagrama de distribuição de espécies para as condições experimentais usadas, no qual para além dos valores das constantes de estabilidade das espécies CuHL e CuL (Modelo I, Tabela 3) foi incluída a hipótese de formação da espécie CuL(OH). Para isso, considerou-se como

estimativa para a constante de estabilidade $\log \beta = 33.8$ ($\log_{10}\beta_{\text{CuL}} + \log_{10}\beta_{\text{Cu(OH)}} = 27.7 + 6.1 = 33.8$). O diagrama de distribuição de espécies (Figura 5) para as condições experimentais usadas, ($[\text{L}_\text{T}]:[\text{Cu}_\text{T}] = 1$, $[\text{Cu}^{2+}] = 1 \times 10^{-3} \text{M}$), mostra que se esta espécie se formar deveria ser refinada entre pH 7.0 e 10.0.

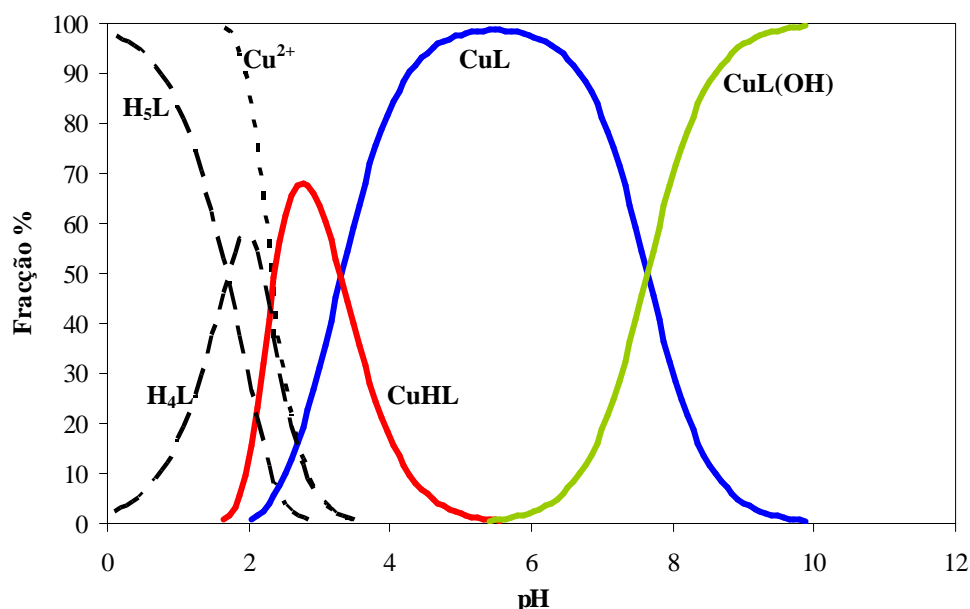


Figura 5- Diagrama de distribuição de espécies para $[\text{L}_\text{T}]:[\text{Cu}_\text{T}] = 1$, $[\text{Cu}^{2+}] = 1 \times 10^{-3} \text{M}$. As espécies consideradas no modelo foram CuHL, CuL e CuL(OH) com os valores de constantes de estabilidade seguintes ($\log \beta$): 21.01, 27.7, 33.8, respectivamente.

Assim sendo, tentou-se refinar a constante de estabilidade para a espécie CuL(OH), mantendo fixo o valor da constante de estabilidade do complexo CuL refinado anteriormente ($\log \beta_{\text{CuL}} = 27.7$) para os pontos colhidos entre pH 7.0 e 10.0. Para todas as titulações efectuadas, o programa de refinação rejeitou sempre a espécie CuL(OH).

Com o intuito de averiguar se o Modelo I é o modelo correcto, traçou-se o diagrama de distribuição de espécies para a razão $[\text{L}_\text{T}]:[\text{Cu}_\text{T}]$ de 1 (Figura 6).

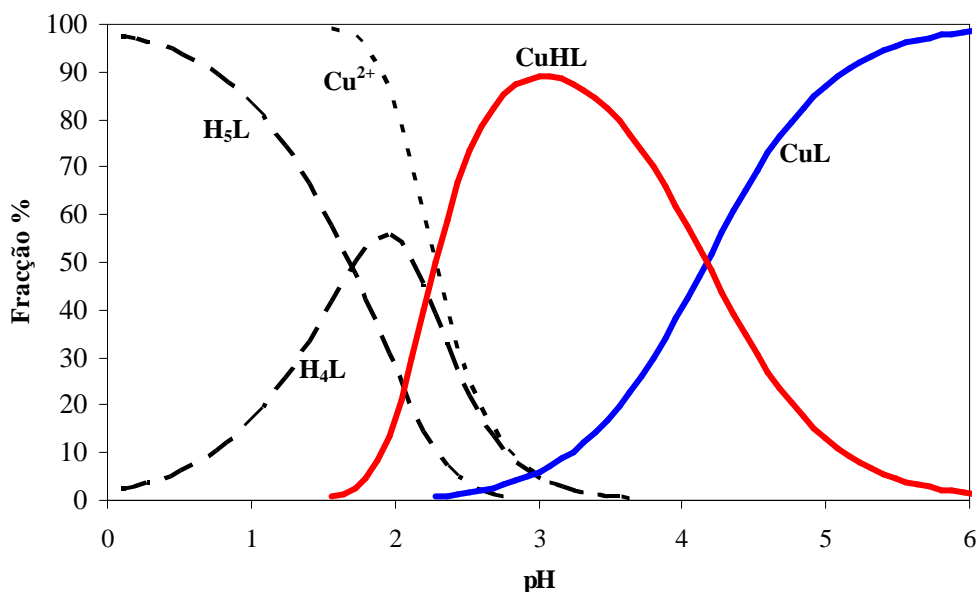


Figura 6- Diagrama de distribuição das espécies para o sistema Cu^{2+} —Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína—OH, $[\text{L}_\text{T}]:[\text{Cu}_\text{T}] = 1$ e $[\text{Cu}^{2+}] = 1 \times 10^{-3} \text{M}$. O modelo considerado inclui as espécies CuHL e CuL com constantes de estabilidade ($\log \beta$) de 31.19 e 27.02, respectivamente.

O diagrama de distribuição de espécies da Figura 6 está de acordo com a Figura 4 uma vez que, para valores de pH próximo de 5 (ou seja pA abaixo de 23) os valores de Z_M tendem para 1, o que indica que a esse pH tem-se praticamente 100% de formação de CuL.

Em face do exposto acima, o modelo final proposto deverá incluir as espécies CuHL e CuL. Os valores das constantes de estabilidade refinadas tendo em conta todos os resultados experimentais são: $\log_{10}\beta_{\text{CuHL}} = 31.19 \pm 0.02$ e $\log_{10}\beta_{\text{CuL}} = 27.02 \pm 0.06$. Saliente-se que estes valores finais das constantes de estabilidade e respectivos erros associados a cada constante de estabilidade foram determinados a partir de um total de 633 pontos, resultantes de 9 titulações, obtidos a partir de 6 soluções independentes.

3.3.3 Constantes de Formação Condicionais

Em aplicações industriais, é sempre mais prático considerar constantes de estabilidade condicionais do que as constantes de estabilidade.

Para avaliar o poder quelante do ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína, calcularam-se os valores das constantes de estabilidade condicionais deste com os metais pesados estudados (cálcio e cobre) e compararam-se com os valores obtidos para o EDTA. Escolheu-se o EDTA por ser o agente quelante mais usado.

As constantes de estabilidade condicionais foram calculadas usando a seguinte relação (Davidge *et al.*, 2001):

$$\log K_{cond} = \log K_{aparente} - \log \alpha_{HL} - \log \alpha_{M(OH)} + \log \alpha_{ML} \quad (3.6)$$

Onde $\log K_{aparente}$ é o logarítmo da constante de formação da espécie metal-ligando 1:1 e α_{HL} e α_M são os coeficientes das reacções laterais. O coeficiente α_{HL} diz respeito à protonação do ligando e é definido como:

$$\alpha_{HL} = 1 + [H^+] \beta_1 + [H^+]^2 \beta_2 + + [H^+]^n \beta_n \quad (3.7)$$

Onde $[H^+]$ é a concentração de H^+ correspondente ao pH em análise e $\beta_1, \beta_2, \beta_n$, são as constantes cumulativas de protonação do ligando. O coeficiente α_M diz respeito a qualquer reacção lateral que compete com o ligando para o metal; para sistemas aquosos no qual apenas o metal e ligando estão presentes, α_M relaciona-se apenas com as reacções de hidrólise do metal, $\alpha_{M(OH)}$, e pode ser calculado de acordo com a equação seguinte:

$$\alpha_{M(OH)} = 1 + [OH^-] \beta'_1 + [OH^-]^2 \beta'_2 + + [OH^-]^n \beta'_n. \quad (3.8)$$

Onde $[OH^-]$ é a concentração de OH^- e $\beta'_1, \beta'_2, \beta'_n$, são as constantes cumulativas de estabilidade dos complexos formados entre o metal e o ião hidróxido.

O coeficiente α_{ML} tem em conta a formação das espécies metal-ligando-protão, MHL, e metal-ligando-hidróxido, ML(OH), e pode ser calculado usando a equação 3.9.

$$\alpha_{ML} = 1 + [H^+]K_{MHL} + [OH^-]K_{ML(OH)} \quad (3.9)$$

A Figura 7 compila os resultados obtidos para as constantes de estabilidade condicionais entre os ligandos Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína ou EDTA e os iões metálicos (cálcio e cobre).

Considerando, como critério de complexação eficiente, valores para as constantes de estabilidade condicionais superiores a seis, a Figura 7 mostra que:

- (i) para o cobre, quer o ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína quer o EDTA são efectivos a partir de pH~3;
- (ii) para o cobre, a partir de pH = 5, o ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína é mais eficiente do que o EDTA;
- (iii) para o cálcio, o EDTA é mais eficaz que a Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína em toda a gama de pH.

Esta análise sugere que a Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína pode ser usada como agente quelante, por exemplo, na remediação de metais pesados de solos contaminados com metais dado que, para além de apresentar potencial biodegradável, é um complexante mais forte para o cobre e mais fraco para o cálcio (micronutriente).

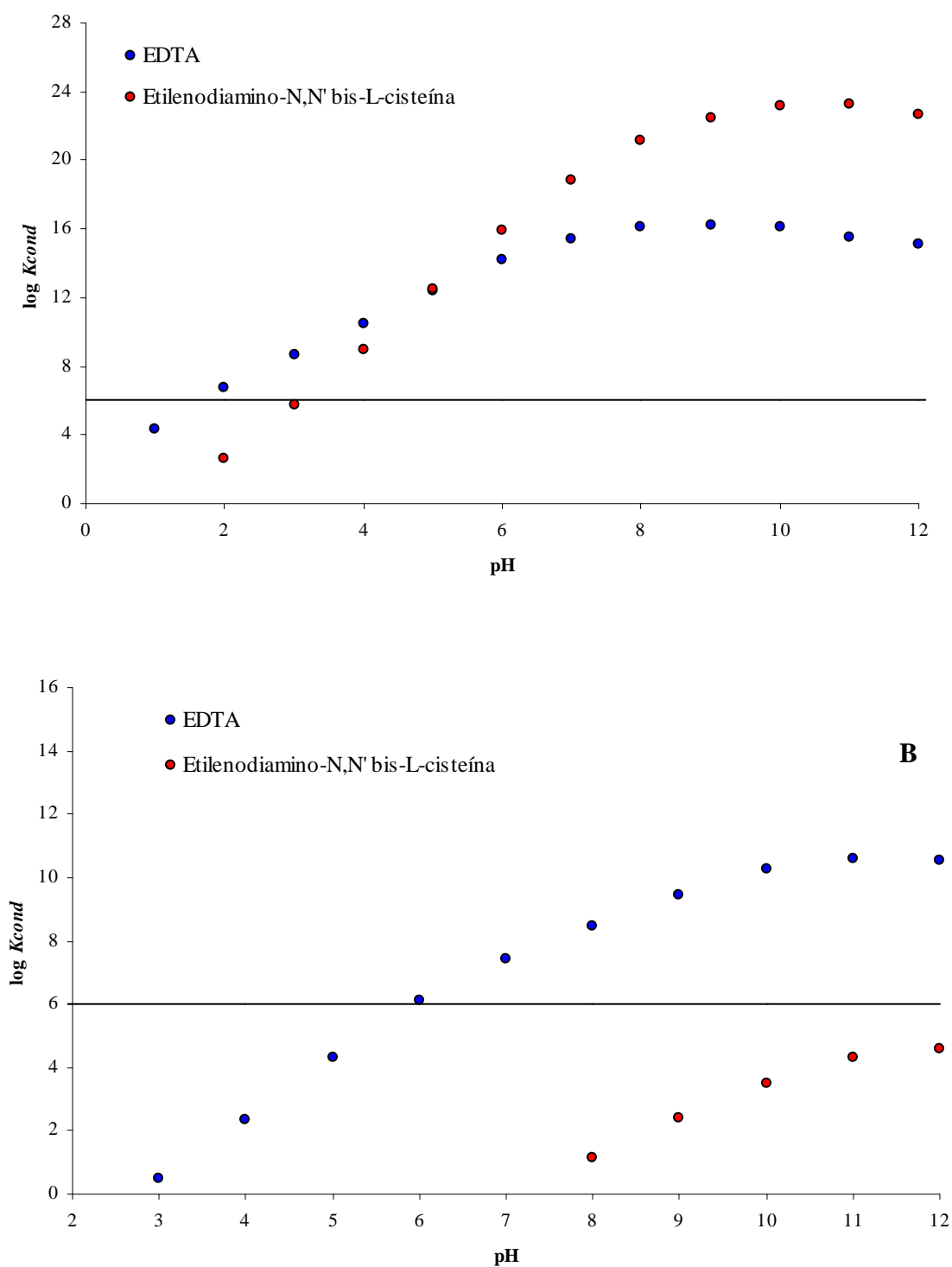


Figura 7- Representação gráfica do logaritmo das constantes condicionais entre o EDTA ou a Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína e o Cu^{2+} (A) ou o Ca^{2+} (B) em função do pH.

4 Estudos de Síntese

4.1 Aspectos Experimentais

4.1.1 Purificação de Solventes e Reagentes

Todos os solventes foram previamente secos ou destilados.

Diclorometano seco (DCM): refluxou-se com pentóxido de fósforo em atmosfera inerte durante 2/4 horas, sendo depois mantido em baixo refluxo, destilando-se apenas antes da sua utilização.

Piridina seca (Pyr): destilou-se sobre hidróxido de potássio por duas vezes consecutivas.

Tetrahidrofurano seco (THF): manteve-se em hidreto de cálcio durante 24 horas, sendo depois destilado. De seguida, refluxou-se sobre fio de sódio e benzofenona até adquirir cor violeta, e manteve-se em baixo refluxo sob atmosfera inerte, destilando-se apenas antes da sua utilização.

Trietilamina seca (TEA): destilou-se sobre hidreto de cálcio.

Os reagentes seguidamente indicados foram destilados, sob pressão reduzida, e mantidos a uma temperatura de 0°C:

- Cloreto oxalílico ($C_2Cl_2O_2$);
- Brometo de Benzilo (BnBr).

4.1.2 Equipamento e Condições Gerais

A cromatografia em camada fina analítica (c.c.f. ou TLC) realizou-se em placas de alumínio com sílica gel Merck 60 GF₂₅₄. As manchas dos compostos foram localizadas por exposição a radiação ultravioleta (254 ou 366) e por imersão do TLC numa solução etanólica de ácido fosfomolibdénico ou numa solução de ninidrina.

Para a cromatografia de coluna utilizou-se sílica gel Kieselgel 60M (0.040-0.063 mm, Merck).

A cromatografia em camada fina preparativa (PLC) foi efectuada em sílica gel Merck 60 GF₂₅₄.

Os pontos de fusão foram medidos num aparelho Buchi Melting Point B-540 e não são corrigidos.

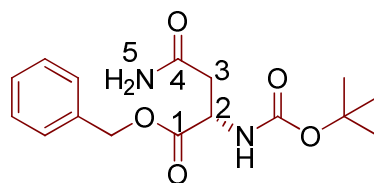
Para traçar espectros de ¹H-RMN usou-se clorofórmio-*d* ou água-*d*₂ como solvente e tetrametilsilano como padrão interno, num aparelho Bruker 400 a uma frequência 400.137471 MHz. Os espectros de ¹³C-RMN foram realizados nas mesmas condições, mas a uma frequência de 100.624087 MHz.

Os espectros de infravermelho foram executados num aparelho FTIR da marca Mattson, efectuando-se a análise das amostras oleosas num filme líquido entre janelas de cloreto de sódio, e as amostras sólidas em pastilhas de brometo de potássio.

Todas as reacções foram executadas sob atmosfera inerte (Árgon), com excepção para os casos especificados.

4.1.3 Descrição Experimental

4.1.3.1 Síntese do (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo



Preparou-se uma solução de ácido (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoico (2.0 g, 8.6 mmol) em THF seco (20 mL). De seguida, adicionou-se TEA seca (1.8 mL, 12.9 mmol, 1.5 eq.) e BnBr (1.5 mL, 11.2 mmol, 1.3 eq.). A mistura reaccional foi deixada sob refluxo, sob atmosfera de árgon e agitação vigorosa. Deu-se a reacção por terminada, ao fim de 2h 30min, quando se verificou por c.c.f. (acetato de etilo/metanol/água – 5/2/1, revelação

com solução de Ninidrina) a conversão total da asparagina de partida. Filtrou-se a mistura reaccional usando-se THF para arrastar todo o produto. De seguida, removeu-se o solvente do filtrado a pressão reduzida, dissolveu-se o sólido resultante em acetato de etilo e lavou-se com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (2×30 mL), para remover algum ácido que tenha permanecido. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. Obteve-se 2.65 g de (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo (rendimento de 95%), sob a forma de um sólido cristalino branco.

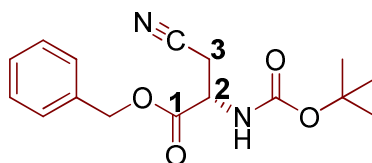
Ponto de fusão: 119.5-120.4°C

IV ν_{\max} (NaCl, cm^{-1}): 1526.19 (CONH); 1655.98 e 1687.99 (carbonilos); 1739.48 (CONH₂); 2987.79 (Ar-H); 3349.76 e 3393.35 (COOH).

^1H -RMN δ (CDCl_3 , ppm): 1.42 (9H, *s*, C(CH₃)₃); 2.75 (1H, *dd*, $J_{3,3'}=16.0\text{Hz}$ e $J_{3,2}=4.0\text{Hz}$, H-3); 2.94 (1H, *dd*, $J_{3',3}=16.0\text{Hz}$ e $J_{3',2}=4.1\text{Hz}$, H-3'); 4.56 (1H, *m*, H-2); 5.18 (2H, *d*, $J=1.9\text{Hz}$, CH₂Ph); 5.52 (1H, *bs*, H-5); 5.64 (1H, *bs*, H-5'); 5.7357 (1H, *d*, $J=8.1\text{Hz}$, NH); 7.34 (5H, *m*, ArH).

^{13}C -RMN δ (CDCl_3 , ppm): 28.26 (C(CH₃)₃); 37.37 (C-3); 50.32 (C-2); 67.37 (CH₂Ph); 80.09 (C(CH₃)₃); 128.17-128.52 (C-Ar); 135.37 (COOC(CH₃)₃); 171.25 (C-1); 172.07 (C-4).

4.1.3.2 Síntese do (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato benzilo



A uma solução de (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo (2.5 g, 7.8 mmol) em DCM seco (25 mL) foram adicionados Pyr (3.5 mL, 43 mmol, 5.3 eq.) e cloreto de tosilo (3.5 g, 18.36 mmol, 2.25 eq.). Terminada a adição a mistura reaccional foi deixada em agitação vigorosa, sob atmosfera de árgon, a uma temperatura de 0-5°C, durante 48 horas. Verificou-se por c.c.f (acetato de etilo/hexano-9/11 e revelação com solução etanólica de ácido fosfomolibdénico) o consumo total do éster benzílico de partida.

No final da reacção, lavou-se a mistura reaccional com uma solução saturada de bicarbonato de sódio, durante meia hora. De seguida, diluiu-se em diclorometano e lavou-se a fase orgânica com uma solução aquosa de ácido fosfórico 1M. Após secagem da fase orgânica, com sulfato de sódio anidro, removeu-se o solvente a pressão reduzida. Obteve-se (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato de benzilo (2.18 g, 92%) sob a forma de um sólido branco cristalino.

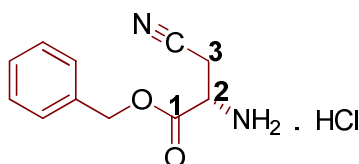
Ponto de fusão: 98.8- 99.8°C

IV ν_{\max} (NaCl, cm^{-1}): 1524.65 (CONH); 1728.68 e 1679.70 (carbonilos); 2251.69 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 2997.82 (Ar-H); 3358.25 (COOH).

^1H -RMN δ (CDCl_3 , ppm): 1.45 (9H, s, $\text{C}(\underline{\text{CH}_3})_3$); 2.93 (1H, dd, $J_{3,3'}=16.8\text{Hz}$ e $J_{3,2}=4.8\text{Hz}$, $\underline{\text{H}}\text{-3}$); 3.01 (1H, dd, $J_{3',3}=16.9\text{Hz}$ e $J_{3',2}=5.1\text{Hz}$, $\underline{\text{H}}\text{-3'}$); 4.53 (1H, m, $\underline{\text{H}}\text{-2}$); 5.25 (2H, s, $\underline{\text{CH}_2}\text{Ph}$); 5.47 (1H, d, $J=5.7\text{Hz}$, $\underline{\text{NH}}$); 7.37 (5H, m, $\text{Ar}\underline{\text{H}}$).

^{13}C -RMN δ (CDCl_3 , ppm): 21.82 ($\text{C}\text{-3}$); 28.19 ($\text{C}(\underline{\text{CH}_3})_3$); 50.38 ($\text{C}\text{-2}$); 68.39 ($\underline{\text{CH}_2}\text{Ph}$); 81.02 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 116.12 ($\underline{\text{C}}\equiv\text{N}$); 128.58-128.86 ($\underline{\text{C}}\text{-Ar}$); 134.44 ($\underline{\text{COOC}}(\text{CH}_3)_3$); 168.81 ($\text{C}\text{-1}$).

4.1.3.3 Síntese do hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo



Preparou-se uma solução de (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato de benzilo (2.38 g, 7.8 mmol) em acetonitrilo (12 mL). Em seguida, adicionou-se água (2 mL, 111 mmol, 14.24 eq.) e ácido trifluoroacético (12 mL, 155.8 mmol, 20.0 eq.). Deixou-se em agitação magnética até verificar-se por c.c.f. (acetato de etilo/hexano-3/7, revelação com solução etanólica de ácido fosfomolibdénico) o consumo do composto inicial (6 horas). Posteriormente adicionou-se à mistura reaccional uma solução de NH_4OH (20 mL) em água (40 mL) a 0°C, de forma a eliminar algum TFA que não tenha reagido. Extraíu-se a fase orgânica com diclorometano (2×50 mL) e secou-se com sulfato de sódio anidro. Após

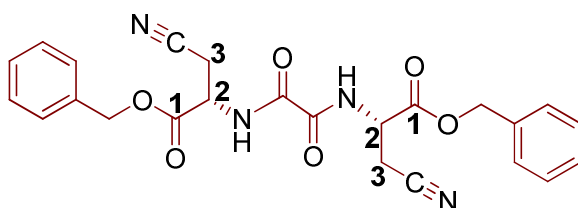
remoção do solvente a pressão reduzida dissolveu-se o sólido na mínima quantidade de diclorometano e introduziu-se excesso de gás HCl. Depois de filtrar e lavar bem com DCM, obteve-se o hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo (1.605 g, 85%), na forma de um pó branco.

IV ν_{\max} (NaCl, cm^{-1}): 1609.12-1655.02 (NH_2); 1744.69 (carbonilos); 2253.62 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 2872.27-2926.08 (Ar-H); 3407.81 (COOH).

^1H -RMN δ (D_2O , ppm): 3.20 (1H, *dd*, $J_{3,3'}=17.7\text{Hz}$ e $J_{3,2}=5.9\text{Hz}$, **H-3**); 3.25 (1H, *dd*, $J_{3',3}=17.8\text{Hz}$ e $J_{3',2}=6.0\text{Hz}$, **H-3'**); 4.55 (1H, *t*, **H-2**); 5.30 (2H, *q*, **CH₂Ph**); 7.40 (5H, *m*, **ArH**).

^{13}C -RMN δ (D_2O , ppm): 18.69 (**C-3**); 48.84 (**C-2**); 69.37 (**CH₂Ph**); 115.79 (**C $\equiv\text{N}$**); 128.73-129.11 (**C-Ar**); 134.24 (**C-1**).

4.1.3.4 Síntese do (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo



A uma solução de hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo em DCM seco adicionou-se TEA seca (2.2 mL, 15.6 mmol, 2.0 eq.). Deixou-se reagir a mistura durante 15 minutos, em agitação vigorosa, à temperatura de 0-5°C e sob atmosfera de árgon. Passado esse tempo, e mantendo as mesmas condições reaccionais, adicionou-se lentamente $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$ (0.34 mL, 3.9 mmol, 0.5 eq.). Deixou-se a mistura reaccional em agitação até se verificar por c.c.f. (acetato de etilo/hexano-3/7, revelação com solução etanólica de ácido fosfomolibdénico) a formação do produto (32 horas).

No final, a mistura reaccional foi diluída em diclorometano e lavada duas vezes com HCl 0.1 M, para remover traços de TEA. Lavou-se ainda a mistura reaccional com uma solução

saturada de bicarbonato de sódio, usou-se sulfato de sódio anidro para secar a fase orgânica resultante e removeu-se o solvente a pressão reduzida. O produto foi purificado numa coluna cromatográfica e com o eluente acetato de etilo/hexano-2/8, obtendo-se (S)- etano-1,2-diona - 1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo, na forma de um sólido cristalino branco (1.005 g, 65%)

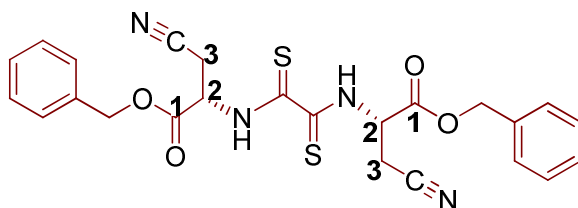
Ponto de fusão: 166.3-168.0°C

IV ν_{\max} (NaCl, cm^{-1}): 1526.39 (CONH); 1744.30 e 1673.14 (carbonilos); 2360.07 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 2945.75 (Ar-H); 3310.23 (COOH).

^1H -RMN δ (CDCl_3 , ppm): 2.99 (2H, *dd*, $J_{3,3'}=17.0\text{Hz}$ e $J_{3,2}=5.3\text{Hz}$, **H-3**); 3.05 (2H, *dd*, $J_{3',3}=17.0\text{Hz}$ e $J_{3',2}=5.4\text{Hz}$, **H-3'**); 4.77 (2H, *tt*, $J_{2,3}=2.2\text{Hz}$, $J_{2,3'}=7.5\text{Hz}$, $J_{2,\text{NH}}=5.4\text{Hz}$, **H-2**); 5.28 (4H, *d*, $J=2.0\text{Hz}$, **CH₂Ph**); 7.38 (10H, *m*, **ArH**); 8.11 (2H, *d*, $J=7.4\text{Hz}$, **NH**).

^{13}C -RMN δ (CDCl_3 , ppm): 20.86 (**C-3**); 49.38 (**C-2**); 68.87 (**CH₂Ph**); 115.29 (**C \equiv N**); 128.05-128.69 (**C-Ar**); 158.53 (**C=O**); 167.41 (**C-1**).

4.1.3.5 Síntese do composto (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo)



A uma solução de (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo) (0.3 g, 1 mmol) em THF seco (34 mL) adicionou-se Reagente de Lawesson (0.53 g, 2 mmol, 0.5 eq.). A mistura reaccional foi deixada sob refluxo (Ozturk *et al.*, 2007), sob atmosfera de árgon e agitação vigorosa. Deu-se por terminada a reacção quando se verificou por c.c.f (acetato de etilo/hexano – 9/11, revelação com solução etanólica de ácido fosfomolibdénico), a conversão total do composto de partida (24 horas). O solvente da mistura reaccional foi removido a pressão reduzida tendo-se obtido um óleo viscoso amarelado. O produto foi

purificado numa coluna flash com o eluente acetato de etilo/hexano – 2/8, conduzindo ao isolamento do (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo), na forma de um óleo viscoso e amarelado (0.082 g, 25%).

IV ν_{\max} (NaCl, cm^{-1}): 1502.67 (CSNH); 1748.55 (carbonilos); 2254.97 e 2305.49 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 2982.00 (Ar-H); 3054.90 e 3206.09 (COOH); 1265.46 (C=S).

^1H -RMN δ (CDCl_3 , ppm): 3.09 (2H, *dd*, $J_{3,3'}=17.1\text{Hz}$ e $J_{3,2}=4.2\text{Hz}$, H-3); 3.32 (2H, *dd*, $J_{3',3}=17.0\text{Hz}$ e $J_{3',2}=5.7\text{Hz}$, H-3'); 5.12 (2H, *m*, H-2); 5.35 (4H, *d*, $J=0.04\text{Hz}$, CH₂Ph); 7.40 (10H, *m*, ArH); 10.62 (2H, *d*, $J=6.8\text{Hz}$, NH).

^{13}C -RMN δ (CDCl_3 , ppm): 18.83 (C-3); 55.10 (C-2); 69.10 (CH₂Ph); 115.07 (C \equiv N); 128.75-129.09-133.97 (C-Ar); 167.17 (C-1); 184.51 (C=S).

4.1.3.6 Síntese do catalisador Raney Nickel (Mozingo, 1941)

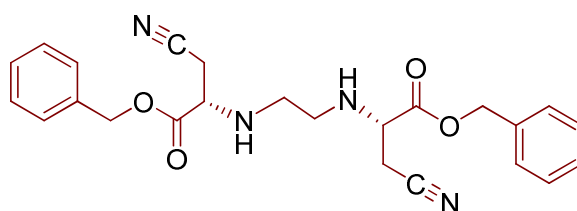
Preparou-se uma solução aquosa de hidróxido de sódio (12.8 g de NaOH em 50 mL de água destilada) e manteve-se esta em agitação e à temperatura de 10°C. Adicionou-se lentamente, liga de níquel-alumina até perfazer um total de 10g. A velocidade de adição foi controlada tendo em conta a temperatura registada no final de cada adição já que, esta deve manter-se nos 10°C, nunca excedendo os 25°C.

No final da adição deixou-se a mistura à temperatura ambiente e verificou-se uma forte libertação de hidrogénio. Promoveu-se o aquecimento da mistura num banho termostático, programado para uma temperatura de 80°C (o volume da mistura reaccional foi mantido, através da adição de água destilada). Ao fim de 2h, constatou-se que a libertação de hidrogénio era quase inexistente e arrefeceu-se a mistura até à temperatura ambiente. Após deposição do níquel, decantou-se, voltou-se a adicionar água destilada, de forma a atingir o volume que estava anteriormente, e ressuspendeu-se o níquel. O passo anterior foi repetido 3 vezes. De seguida, decantou-se novamente a mistura e juntou-se uma solução de 1.7 g de NaOH em 17 mL de água destilada, para repor o nível de líquido inicial. O níquel foi lavado por suspensão em água destilada e decantação, até à solução decantada atingir pH neutro.

Posteriormente o processo de lavagem foi repetido 3 vezes com etanol destilado e 3 vezes com etanol absoluto.

O Raney Níquel é um produto facilmente inflamável pelo que deve ser mantido, a tempo inteiro, mergulhado em líquidos. Por este motivo, armazenou-se o referido produto com bastante etanol absoluto.

4.1.3.7 Tentativa de síntese de di-[2(S)-(2- amino-3-ciano propanoato de benzilo)]-dithionooxalilamida (Gassman e Bergen, 1977)



A 2 mL de etanol absoluto juntou-se 40 mg de (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo) e de raney níquel em excesso (6 colheres pequenas). De seguida, deixou-se a mistura reaccional em agitação vigorosa e sob atmosfera de árgon. O término da reacção foi detectado por c.c.f (acetato de etilo/hexano - 5/5, revelação com solução etanólica de ácido fosfomolibdénico). No final da reacção separou-se, por decantação, o catalisador da mistura reaccional e lavou-se o catalisador com etanol absoluto, durante 15 minutos.

Posteriormente juntou-se a solução etanólica, resultante da lavagem, com a mistura reaccional. A remoção do solvente a pressão reduzida conduziu ao aparecimento de um resíduo esverdeado, não identificado.

4.2 Apresentação e Discussão de Resultados

Nesta secção e a título de resposta a um dos objectivos da presente tese, são apresentados estudos de síntese de compostos precursores de dois ligandos potencialmente biodegradáveis.

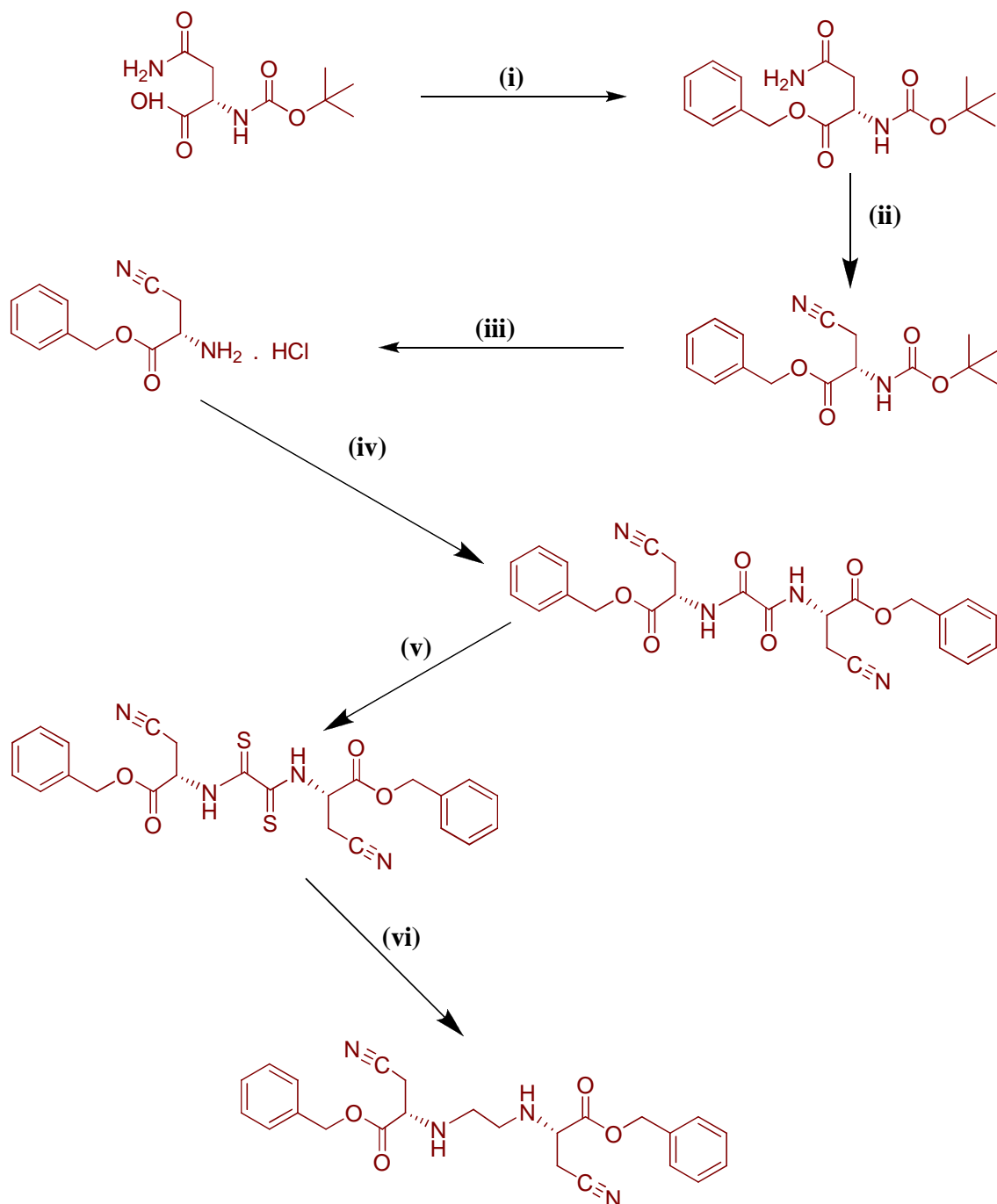
A Figura 1 (a) e (b), apresentada na secção de Estado da Arte, exhibe a estrutura molecular dos dois ligandos, potencialmente biodegradáveis, que podem ser facilmente obtidos a partir dos compostos sintetizados.

O composto sintetizado que, de forma mais directa, permite chegar aos ligandos apresentados é o di-[2(S)-(2-amino-3-ciano propanoato de benzilo)]-dithionooxalilamida. Tentou-se preparar este composto, de acordo com a estratégia sintética apresentada no Esquema 1, a partir do reagente comercialmente disponível, o aminoácido L-asparagina protegido sob a forma de carbamato, (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoico.

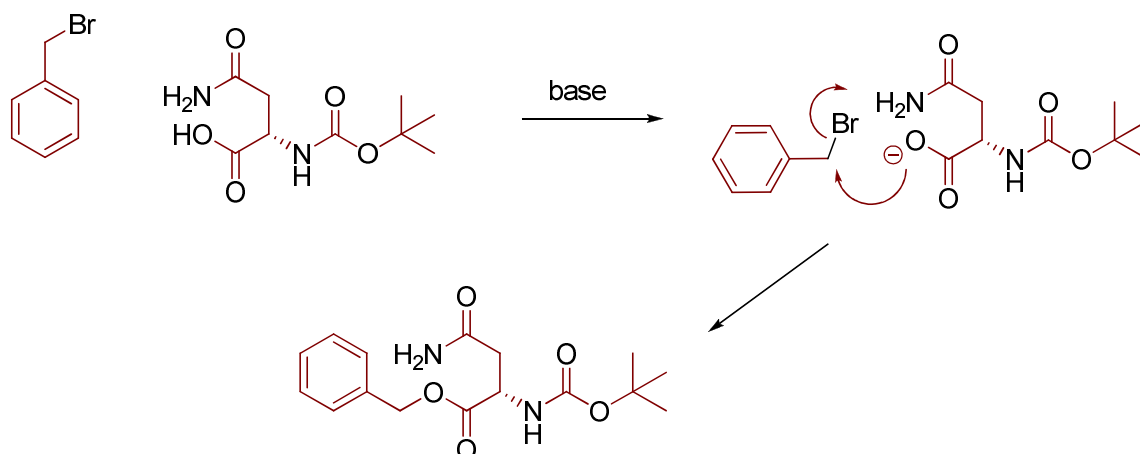
A asparagina apresenta três grupos funcionais polares com carácter nucleófilo e com tendência para formar pontes de hidrogénio. Assim, foi necessário adoptar uma estratégia de protecção/desprotecção que permitisse promover a regiosselectividade pretendida.

Neste sentido, os dois primeiros passos reaccionais, (i) e (ii), correspondem à protecção selectiva (e temporária) dos grupos ácido carboxílico e amida da cadeia lateral da asparagina, dado que o grupo amina do aminoácido já se encontra protegido sob a forma de carbamato (Boc). As protecções do grupo carboxílico e do grupo amida da cadeia lateral foram efectuadas por esterificação e por desidratação da amida a nitrilo, respectivamente, segundo métodos descritos por Christie e Rapoport (1985).

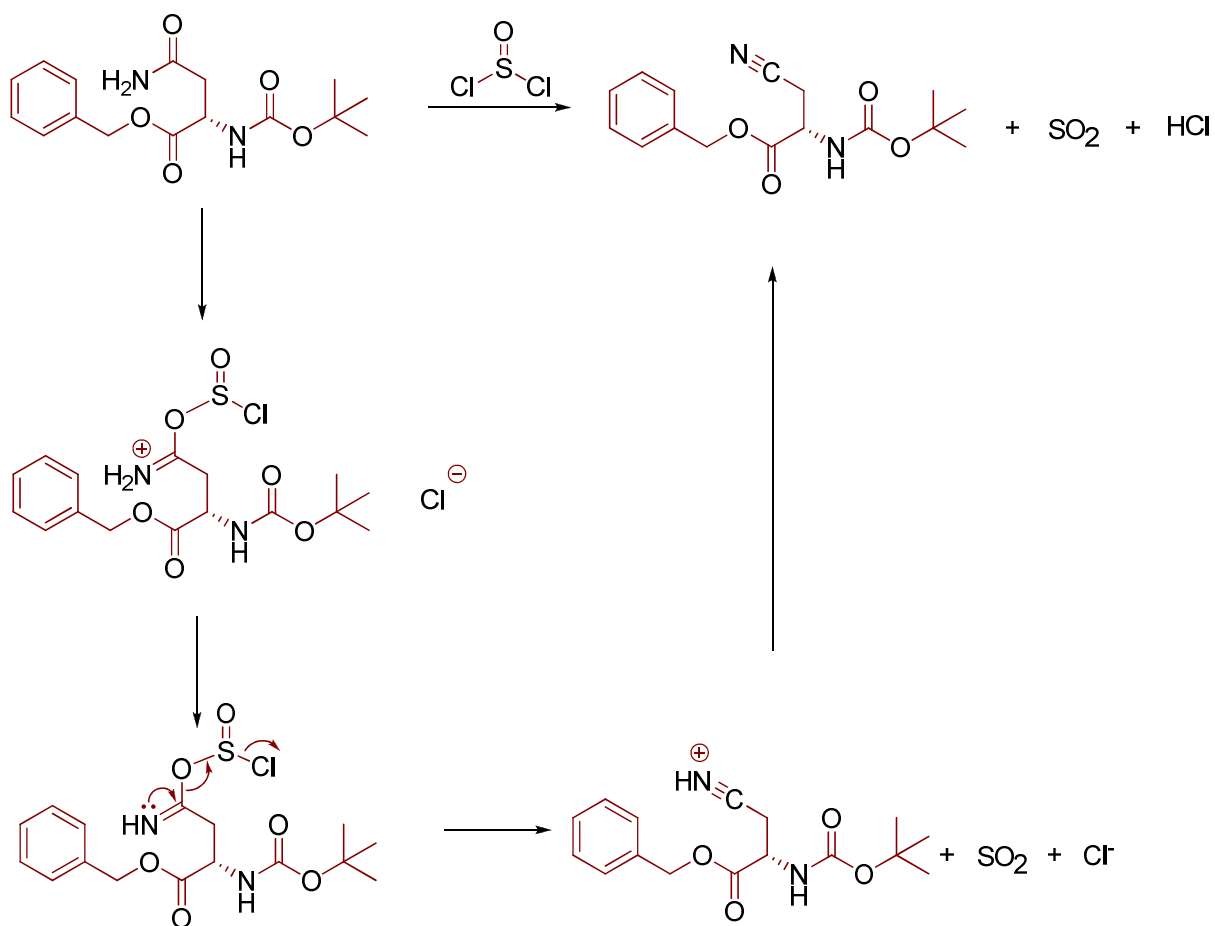
Nos Esquemas 2 e 3 são indicadas possíveis etapas de protecção e desprotecção.



Esquema 1- Síntese do di-[2(S)-(2-amino-3-ciano propanoato de benzilo)]-dithionooxalilamida. Reagentes e condições reacionais: **(i)** BnBr (1.3 eq.), TEA (1.5 eq.), THF, Δ , 2h 30min; **(ii)** TsCl (2.25 eq.), Pyr (5.3 eq.), DCM, 0-5°C, 48h; **(iii)** TFA (20.0 eq.), H₂O (14.24 eq.), CH₃CN, t.a., 6 h; **(iv)** C₂Cl₂O₂ (0.5 eq.), TEA (2.0 eq.), DCM, 0-5°C, 32h; **(v)** THF (34 mL), Reagente de Lawesson's (0.5 eq.), Δ , 24h; **(vi)** Etanol absoluto (2 mL), Raney Nickel em excesso (6 colheres pequenas), t.a., 8h.



Esquema 2- Mecanismo reaccional envolvido na esterificação do ácido carboxílico por benzilação.



Esquema 3 - Mecanismo reaccional envolvido na desidratação da amida.

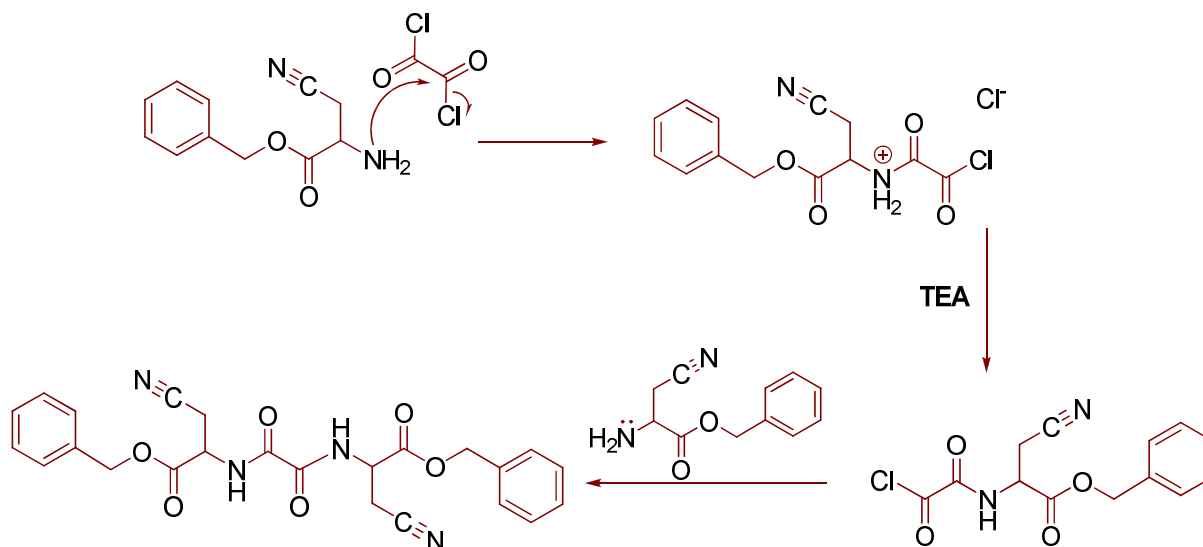
Com intuito de garantir que os produtos sintetizados correspondem aos esperados realizaram-se alguns testes de natureza química. Estes testes podem ser muito diversificados, no entanto, apenas foram consideradas as seguintes análises: ponto de fusão (se aplicável), espectroscopia de infravermelho (IV), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono (^{13}C -RMN), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (^1H -RMN), “Heteronuclear Multiple Quantum Correlation” (HMQC) e “Correlated Spectroscopy” (COSY). No Anexo A apresentam-se todos os espectros obtidos para os diferentes compostos sintetizados.

Atendendo ao espectro de ^1H -RMN do produto obtido na etapa (i) do Esquema 1, pode concluir-se que o aparecimento do sinal a 7.34 ppm revela a presença do anel aromático, que de grosso modo, é a única alteração promovida por esta reacção. Por outro lado, é possível afirmar que no ^1H -RMN, o sinal relativo ao próton do ácido carboxílico não aparece dado que, se existisse localizar-se-ia entre 9 e 12 ppm (Pretsch *et al.*, 2000). Um outro indício do sucesso desta reacção é o aparecimento do sinal dos dois prótons fenílicos (CH_2Ph) a 5.18 ppm.

O espectro de ressonância magnética nuclear de próton demonstra que a reacção de desidratação da amida, etapa (ii) do Esquema 1, foi bem sucedida por não contemplar os singletos largos, característicos dos dois prótons respeitantes à mesma, na forma não protegida. Por outro lado, no espectro de infravermelho é evidente o aparecimento do pico relativo ao nitrilo e supressão de um dos picos característicos dos carbonilos.

Na etapa (iii) do Esquema 1 procedeu-se à desprotecção da amina, que se encontra protegida sob a forma de carbamato. Para o efeito, recorreu-se ao método da hidrólise ácida, descrito por Christie e Rapoport (1985). O rendimento desta etapa foi de 85%. Pela análise dos espectros correspondentes ao produto produzido nesta etapa, pode confirmar-se que se trata do hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo: (a) No espectro de ^1H -RMN verifica-se que o singuleto de nove prótons, a desvio químico próximo de 1.45, responsável pela presença do grupo Boc, desapareceu; (b) No espectro ^{13}C -RMN já não se encontra presente o sinal respeitante ao carbonilo do grupo Boc.

Tal como se pode constatar pelo Esquema 1, o passo (iv) refere-se ao acoplamento de dois aminoácidos. O mecanismo reaccional presente nesta etapa, encontra-se exemplificado no Esquema 4 (Soares, 2007).



Esquema 4- Mecanismo de adição do cloreto oxalílico ao hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo.

Não houve alteração no que diz respeito à localização e tipo de sinal nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, relativamente ao composto produzido na etapa (ii) do Esquema 1. A única alteração deve-se à duplicação do número de prótons em cada sinal, no espectro de ressonância magnética nuclear de protão, que advém do facto da molecular ser simétrica. Note-se que este passo é crucial para a síntese de ligandos potencialmente biodegradáveis dado que, é a partir dele que se forma um composto simétrico e com dois carbonos quirais (*s*).

Esta etapa de síntese não é nova (Soares, 2007) mas, foram introduzidas algumas alterações ao nível de condições experimentais (por exemplo o uso de metade da quantidade de cloreto oxalílico) que conduziram a um aumento do rendimento (de 12 % para 65 %). A diminuição na quantidade de reagente é um factor bastante importante na medida em que, para além de se diminuir os custos associados à produção do composto e de se produzirem menos efluentes, contribuindo deste modo para uma maior sustentabilidade, conseguiu-se melhorar o rendimento.

É importante referir que, o composto (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo pode ser sintetizado por outra via, que não a descrita na secção de descrição experimental. Essa outra estratégia surgiu, tal como a que se considera mais viável, de um conjunto de tentativas de síntese do composto pretendido. A via alternativa consiste em dissolver o (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato de benzilo na mínima quantidade de éter etílico e introduzir excesso de gás HCl. Apesar de conduzir ao mesmo produto, optou-se por não dar relevância a esta via dado que, a reacção se revelou muito lenta, ou seja, seria necessário muito mais tempo de reacção para atingir o mesmo rendimento.

A etapa (v) indicada no Esquema 1, diz respeito a uma reacção de tionação recorrendo ao reagente de Lawesson. Para esta reacção apresenta-se no Esquema 5, o mecanismo reaccional aceite (Eychenne e Mouloungui, 2001).

Quanto aos espectros do produto da reacção de tionação não se observam grandes diferenças relativamente ao produto sintetizado na etapa anterior, o que era de esperar. A única diferença reside nos sinais correspondentes à presença do grupo tiona.

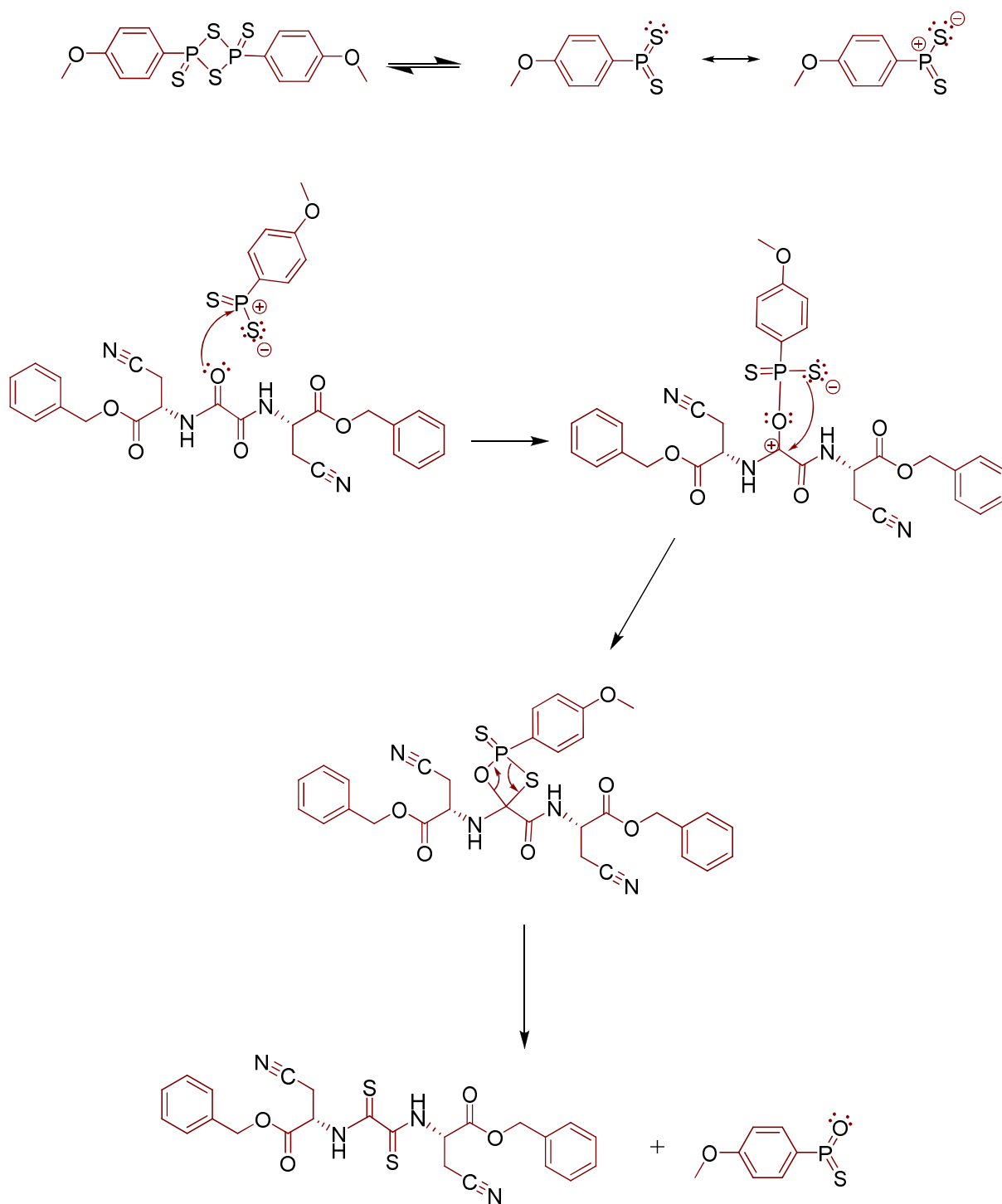
É importante referir que antes de produzir o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo), de acordo com o procedimento relatado na secção da descrição experimental, realizaram-se outras tentativas que acabaram por não ser bem sucedidas:

(a) A uma solução de (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo (0.1 g, 1 mmol) em THF seco (11.4 mL) adicionou-se Reagente de Lawesson (0.18 g, 2 mmol, 0.5 eq.). A mistura reaccional foi deixada num banho a T=55°C, sob atmosfera de árgon e agitação vigorosa (Kaleta *et al.*, 2006). O produto foi filtrado sob celite e purificado em placa preparativa, com o eluente Acetato de Etilo / Hexano - 4.5 / 5.5;

(b) A uma solução de (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo (0.05 g, 1 mmol) em THF seco (5.8 mL) adicionou-se Reagente de Lawesson (0.05 g, 1 mmol, 1 eq.). A mistura reaccional foi deixada à temperatura ambiente, sob atmosfera de árgon e agitação vigorosa.

A etapa (vi) do Esquema 1, realizada dentro das condições mencionadas no mesmo, não conduziu aos resultados esperados. A análise ¹H-RMN ao composto obtido indicou que ainda havia muito composto inicial. Muito provavelmente seria necessário aumentar a quantidade

de Raney Nickel mas, como não houve tempo não foi possível fazê-lo. O rendimento global de produção do composto (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo) é de 12 %.



Esquema 5 - Mecanismo reaccional da tionação com o reagente de Lawesson.

5 Conclusões Gerais

Os estudos de complexação do sistema Ca^{2+} —Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína—OH revelaram que o modelo que melhor define o sistema é composto por CaHL , CaL e CaL_2 , sendo as constantes de estabilidade: $\log_{10}\beta_{\text{CaHL}}=14.53\pm0.03$, $\log_{10}\beta_{\text{CaL}}=4.79\pm0.01$ e $\log_{10}\beta_{\text{CaL}_2}=8.38\pm0.04$.

Relativamente ao sistema Cu^{2+} —Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína—OH, o modelo mais adequado inclui CuHL e CuL , com constantes de estabilidade $\log_{10}\beta_{\text{CuHL}}= 31.19 \pm 0.02$ e $\log_{10}\beta_{\text{CuL}}= 27.02 \pm 0.06$.

A determinação das constantes condicionais para os sistemas metal- Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína e metal-EDTA permitiu avaliar o poder quelante, do ligando estudado face ao tradicional EDTA. Assim, conclui-se que o ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína, é melhor que o EDTA, por exemplo na remediação de solos contaminados com cobre, porque é um complexante mais forte com o Cu^{2+} e mais fraco com o Ca^{2+} (micronutriente) do que o EDTA.

No que diz respeito aos estudos de síntese, promoveram-se alterações na etapa de produção do (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo), como por exemplo a redução da quantidade de cloreto de oxalílico para metade, e implementaram-se novas etapas para a produção do (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo) e do di-[2(S)-(2- amino-3-ciano propanoato de benzilo)]-ditionooxalilamida. A diminuição na quantidade de reagente é um factor bastante importante na medida em que, para além de se diminuírem os custos associados à produção do composto e de se produzirem menos efluentes, contribuindo deste modo para uma maior sustentabilidade, conseguiu-se melhorar o rendimento. O rendimento global de produção do composto (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo) foi de 12 %.

Não foi possível obter o di-[2(S)-(2- amino-3-ciano propanoato de benzilo)]-ditionooxalilamida de acordo com o procedimento apresentado. Muito provavelmente seria necessário aumentar a quantidade de catalisador raney nickel adicionado, dado que o espectro ^1H -RMN indica a presença de composto inicial.

6 Avaliação do Trabalho

6.1 Objectivos Realizados

Atendendo ao tempo disponível e ao volume de trabalho que este tema comporta pode dizer-se que os objectivos do trabalho foram realizados. É um tema actual e que ainda possui muitas frentes de pesquisa, merecendo portanto mais tempo, para que possa ser totalmente concluído.

6.2 Limitações e Trabalho Futuro

Como se pode verificar não foi possível obter o di-[2(S)-(2- amino-3-ciano propanoato de benzilo)]-dithionooxalilamida, de acordo com o procedimento usado na etapa (vi) do Esquema 1. Espera-se que no futuro possam ser introduzidas alterações, ao nível de condições reaccionais ou até de reagentes, que conduzam a um resultado satisfatório. Uma vez sintetizado o referido composto, segue-se a redução ou hidrólise do grupo nitrilo e a desprotecção do grupo carboxílico, com o intuito de chegar aos dois ligandos biodegradáveis apresentados na Figura 1. Sugere-se para a desprotecção do grupo carboxílico uma hidrogenação catalisada por paládio segundo o processo descrito por Jarosz e Listkowski (2003) e Green e Wuts (1991). Relativamente à redução do grupo nitrilo aposta-se na utilização do catalisador raney nickel, adaptando a quantidade deste à situação pretendida.

No que toca à complexação é de todo importante continuar o estudo de complexação para o ligando Etilenodiamino-N, N' bis-L-cisteína. Sugere-se que se estude a interacção deste ligando potencialmente biodegradável, com os metais pesados Fe^{3+} , Mn^{2+} e Hg^{2+} .

6.3 Apreciação Final

Este trabalho permitiu contactar com duas grandes áreas completamente diferentes, mas complementares, dando uma visão mais abrangente. Como já se referiu, é um tema muito actual, com pouca informação e que requer tempo para que se possa chegar a resultados mais conclusivos.

Devido ao grande impacto desta área de investigação científica, os resultados obtidos deverão ser um incentivo para trabalhos futuros.

7 Bibliografia

- Albert, A., Serjeant, E.P. *Ionisation Constant of Acids and Bases*, chapter 2 (1962).
- Belly, R.T., Lauff, J.J., Goodhue, C.T. Degradation of Ethylenediaminetetraacetic Acid by Microbial Populations from an Aerated Lagoon. *Appl. Microbiol.* **29**, 787-794 (1975).
- Christie, B.D., Rapoport, H. Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-apovincamine Through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. *J.Org. Chem.*, **50**, 1239-1246 (1985).
- Davidge, J., Thomas, C.P., Williams, D.R. Conditional formation constants or chemical speciation data? *Chemical Speciation and Bioavailability*, **4**, 13 (2001).
- Dietz, F. New Results Concerning with EDTA Content in Drinking Water. *Gwf-Wasser/Abwasser GWF*, **128**, 286-288 (1987).
- Eychenne, V.R., Mouloungui, Z.P. Convenient Thionation of Triglycerides with Lawesson's Reagent. *JAOCs*, **78**, (2001).
- Frimmel, F.H., Grenz, R., Kordik, E., Dietz F. NTA and EDTA in Surface Waters in Germany. *Vom Wasser*, **72**, 175-184 (1989).
- Gassman, P.G., Bergen, T.J.V. Indoles From Anilines: Ethyl 2-methylindole-5-carboxylate. *Organic Syntheses*, **6**, 601 (1977).
- Green, T.W., Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd ed., Wiley-Interscience, New-York, 252-254 (1991).
- Hyvönen, H., Orama, M., Saarinen, H., Aksela, R. Studies on Biodegradable Chelating Ligands: Complexation of Iminodisuccinic Acid (ISA) with Cu(II), Zn(II), Mn(II) and Fe(III) Ions in Aqueous Solution. *Journal Chemistry Society Faraday Trans.*, **5**, 4644-4648 (2003).
- Jacobson, L. Maintenance of Iron Supply in Nutrient Solutions by a Single Addition of Ferric Potassium Ethylenediamine Tetra-Acetate. *Plant Physiol.* **26**, 411-413 (1951).

- Jarosz, S., Listkowski, A. Synthesis of Macrocyclic Derivatives Containing a Sucrose Backbone. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **22**, 753-763 (2003).
- Kaleta, Z., Makowski, B.T., Soós, T., Dembinski, R. Thionation using Fluorous Lawesson's Reagent. *Organic letters*, **8**, 1625-1628 (2006).
- Kari, F.G., Giger, W. Speciation and Fate of Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) in Municipal Waste-Water Treatment. *Water Res.*, **30**, 122-134 (1996).
- Knepper, T.P. Synthetic Chelating Agents and Compounds Exhibiting Complexing Properties in the Aquatic Environment. *Trends in Analytical Chemistry*, **22**, 708-724 (2003).
- Leštan, D., Luo, C., Li, X. The use of Chelating Agents in the Remediation of Metal-Contaminated Soils: a Review. *Elsevier. Environmental pollution*, **153**, 3-13 (2008).
- Li, Y., Martell, A.E., Hancock, R.D., Reibenspies, J.H., Anderson, C.J., Welch, M.J. *N,N'*-Ethylenedi-L-cysteine (EC) and Its Metal Complexes: Synthesis, Characterization, Crystal Structures, and Equilibrium Constants. *American Chemical Society*, **35**, 404-414 (1996).
- Marsicano, F., Monberg, C., Martincigh, B.S., Murray, K., May, P.M., Williams, D.R. The Existence and Stability of Mixed-Ligand Complexes in Aqueous Solutions Containing Zinc and Cyanide Ions Elevated pH Values, *Journal of Coordination Chemistry*, **16**, 321-339 (1988).
- May, P.M., Murray, K., Williams, D.R. The Use of Glass Electrodes for the Determination of Formation Constants-II. Simulation of Titration data. *Talanta*, **32**, 483-489 (1985).
- May, P.M., Murray, K., Williams, D.R. The Use of Glass Electrodes for the Determination of Formation Constants-III. Optimization of Titration Data: the ESTA Library of Computer Programs, *Talanta*, **35**, 825-830 (1988).
- Means, J.L., Kuzak, T., Crerar, D.A. Relative Degradation Rates of NTA, EDTA and DTPA and Environment Implications. *Environ. Pollut. Ser. B* **1**, 45-60 (1980).
- Mozingo, R. Catalyst, Raney Nickel, W-2. *Organic Syntheses*, **21**, 15 (1941).

O'Dowd, R.W., Hopkins, D.W. Mineralization of Carbon from D- and L aminoacids and D-Glucose in two Contrasting Soils, *Soil. Biol. Biochem.*, **30**, 2009-2016 (1998).

Ozturk, T., Ertas, E., Mert, O. Use of Lawesson's Reagent in Organic Syntheses. *Chem. Rev.*, **107**, 5210-5278 (2007).

Pitter, P., Sýkora, V. Biodegradability of Ethylenediamine-Based Complexing Agents and Related Compounds. *Pergamon. Chemosphere*, **44**, 823-826 (2001).

Pitter, P., Sýkora, V., Bittnerová I. *Biological Degradation of Organic Complexing Agents and their Legislation in Czech Republic*, Berichte Nr. 153 aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft, Technische Universität München (1999).

Polettini, A., Pomi, R., Rolle, E. *et al.* A kinetic Study of Chelant-Assisted Remediation of Contaminated Dredged Sediment. *Journal of Hazardous Materials B*, **137**, 1458-1465, (2006).

Pretsch, E., Bühlmann, P., Affolter, C. *Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data*, 3rd Enlarged English Edition (2000).

Rossotti, F.J.C., Rossotti, H. Potenciometric titrations using Gran Plots, *Journal of Chemical Education*, **42**, 37 (1965).

Schowaneck, D., Feijtel, T.C.J., Perkins, C.M., Hartman, F.A., Federle, T.W., Larson, R.J. Biodegradation of [S,S], [R,R] and Mixed Stereoisomers of Ethylene Diamine Disuccinic Acid (EDDS), a Transition Metal Chelator. *Pergamon. Chemosphere*, **34**, 2375-2391 (1997).

Smith, R.M., Martell, A.E. *NIST Standard Reference Database 46. NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database*, Version 8.0, US Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology (2004).

Soares, C.P. *Novo Agente de Quelação Potencialmente Biodegradável Útil em Processos de Remediação de Solos Contaminados com Metais Pesados*. Tese de mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2007.

Sýkora, V., Pitter, P., Bittnerová, I., Lederer, T. Biodegradability of Ethylenediamine-Based Complexing Agents. *Wat. Res.*, **35**, 2010-2016 (2001).

Takahashi, R., Fujimoto, N., Suzuki, M., Endo, T. Biodegradabilities of Ethylenediamine-N,N'-disuccinic acid (EDDS) and Other Chelating Agents. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1957-1959 (1997).

Tiedje, J.M. Microbial Degradation of Ethylenediaminetetraacetate in Soils and Sediments. *Appl. Microbial*, **30**, 327-329 (1975).

Vandevivere, P., Hammes, F., Verstraete, W., Feijtel, T., Schowanek, D. Metal Decontamination of Soil, Sediment and Sewage Sludge by Means of Transition Metal Chelant [S,S]-EDDS. *Journal of Environmental Engineering*, 802-811 (2001).

Anexo A- Espectros dos Compostos Sintetizados

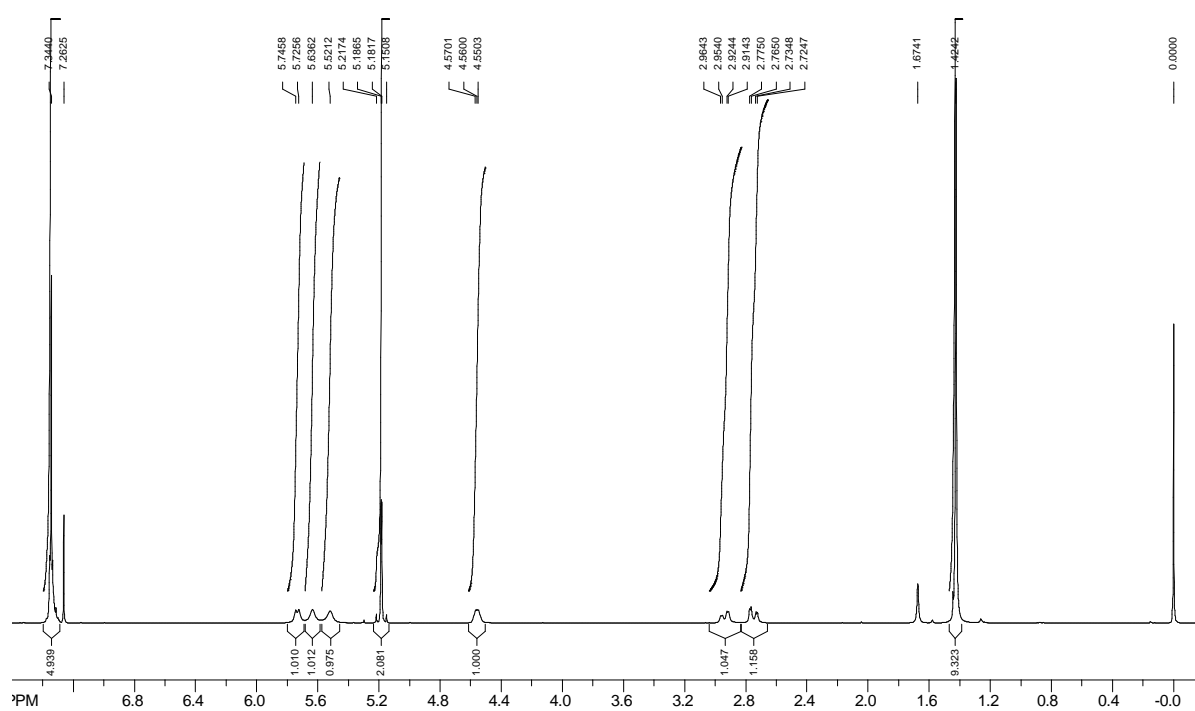


Figura A 1- Espectro de ^1H -RMN para o (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo.

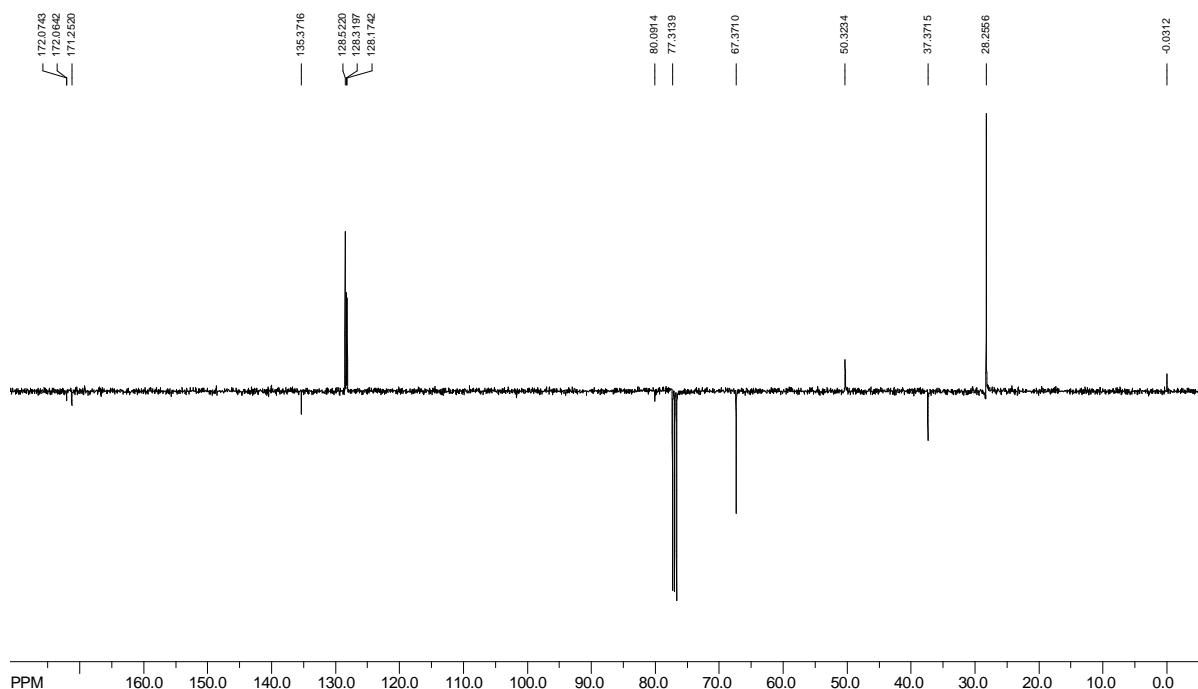


Figura A 2- Espectro de ^{13}C -RMN para o (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo.

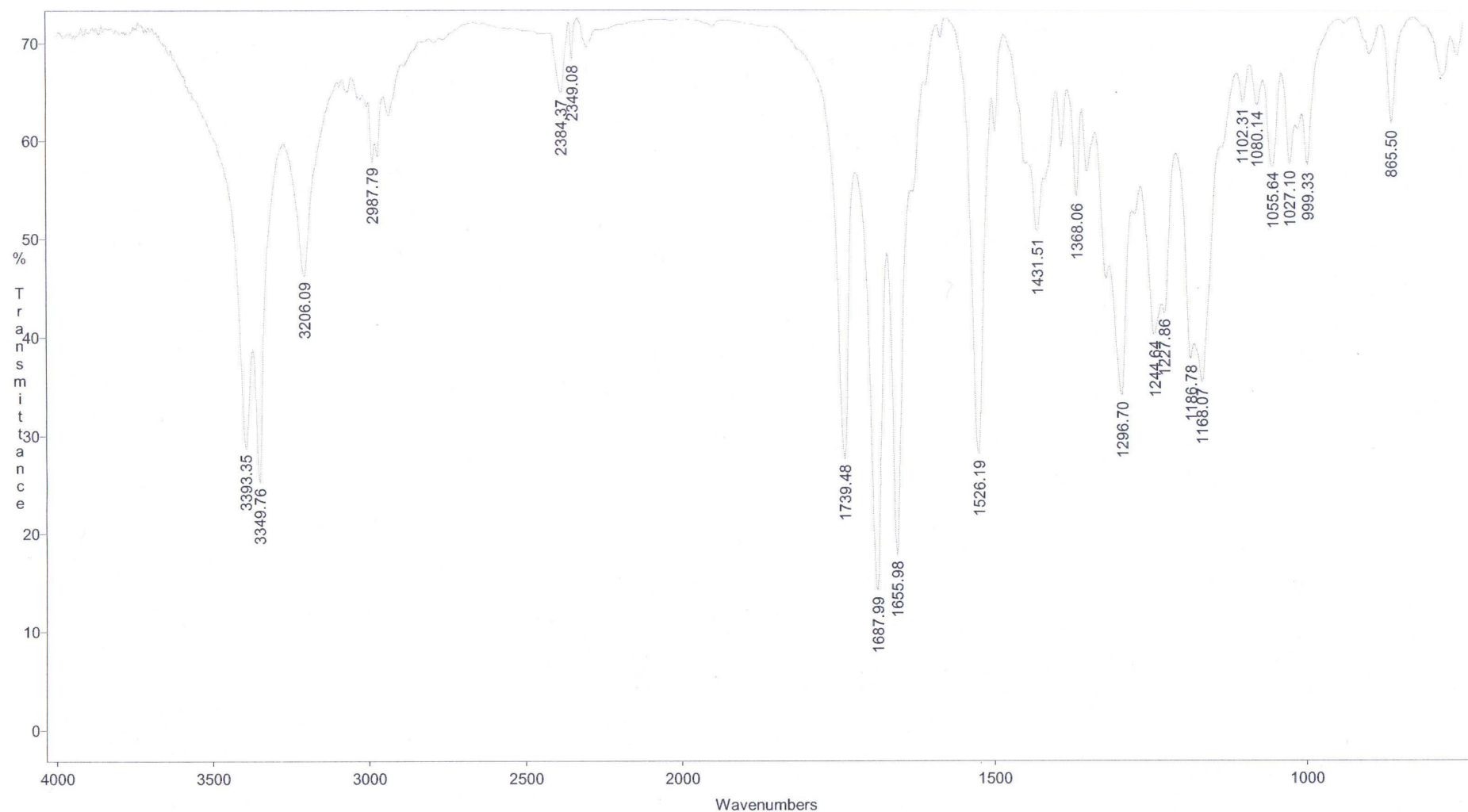


Figura A 3- Espectro de infravermelho para o (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo.

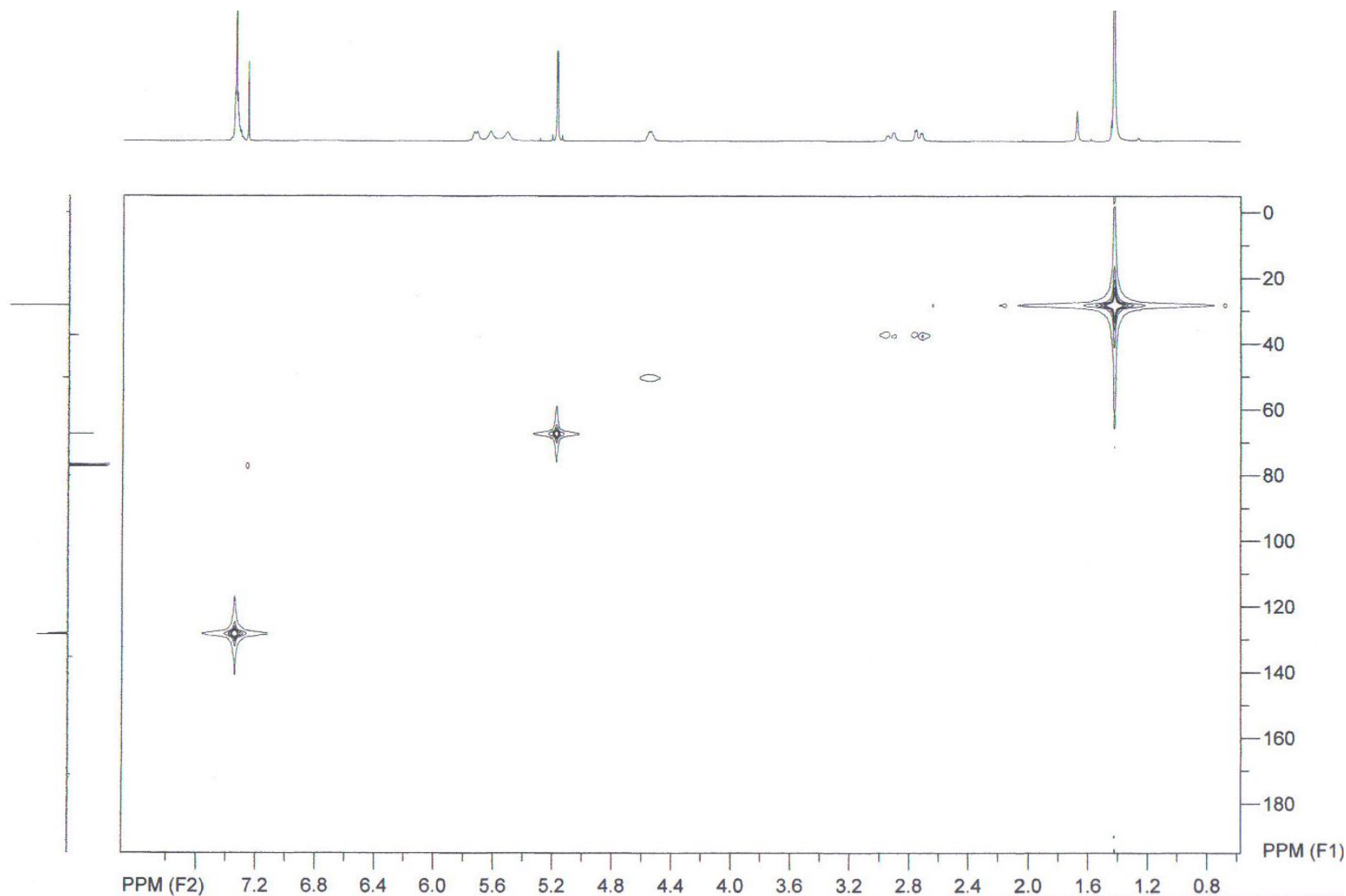


Figura A 4- Espectro HMQC para o (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo.

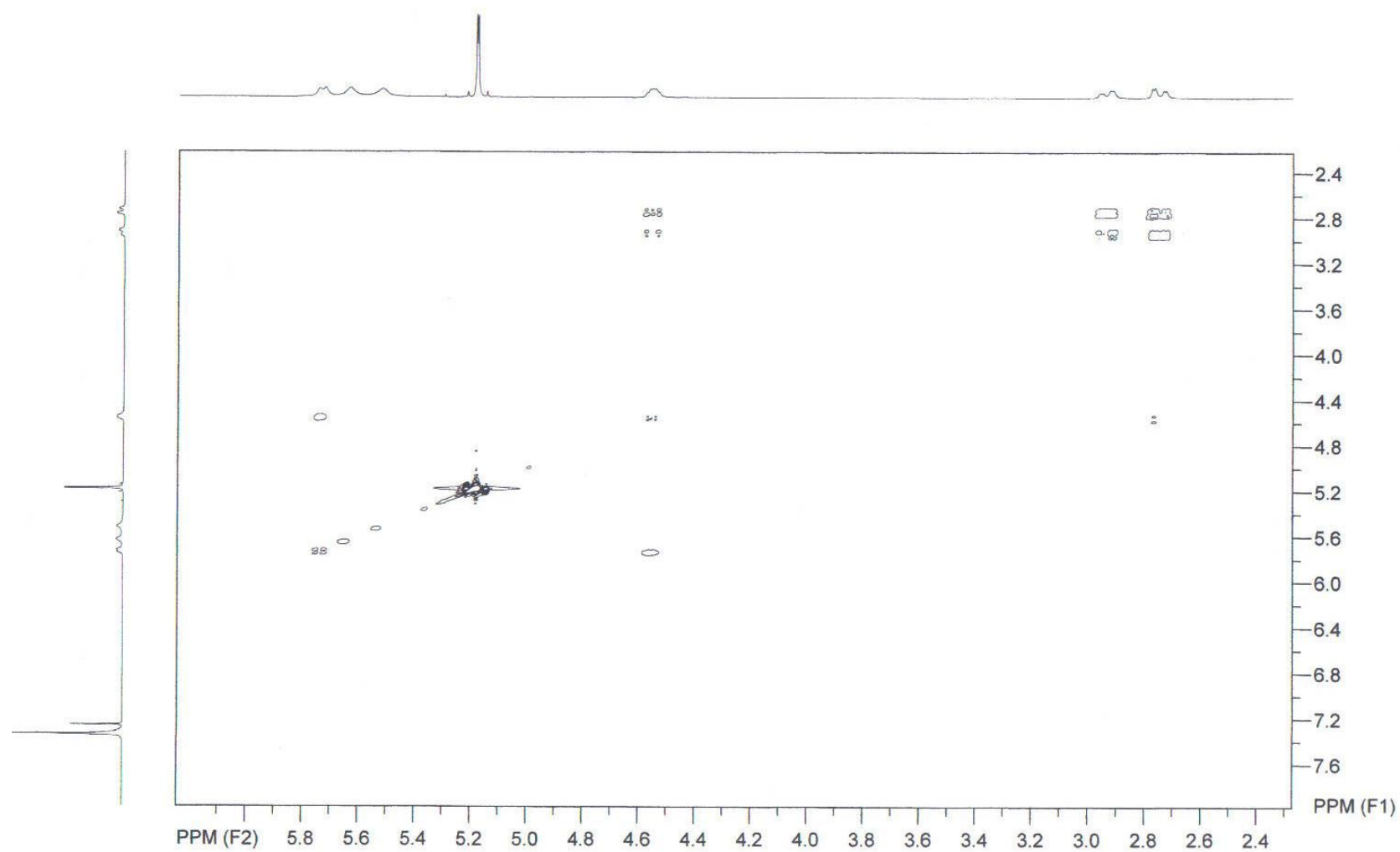


Figura A 5- Espectro COSY para o (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo.

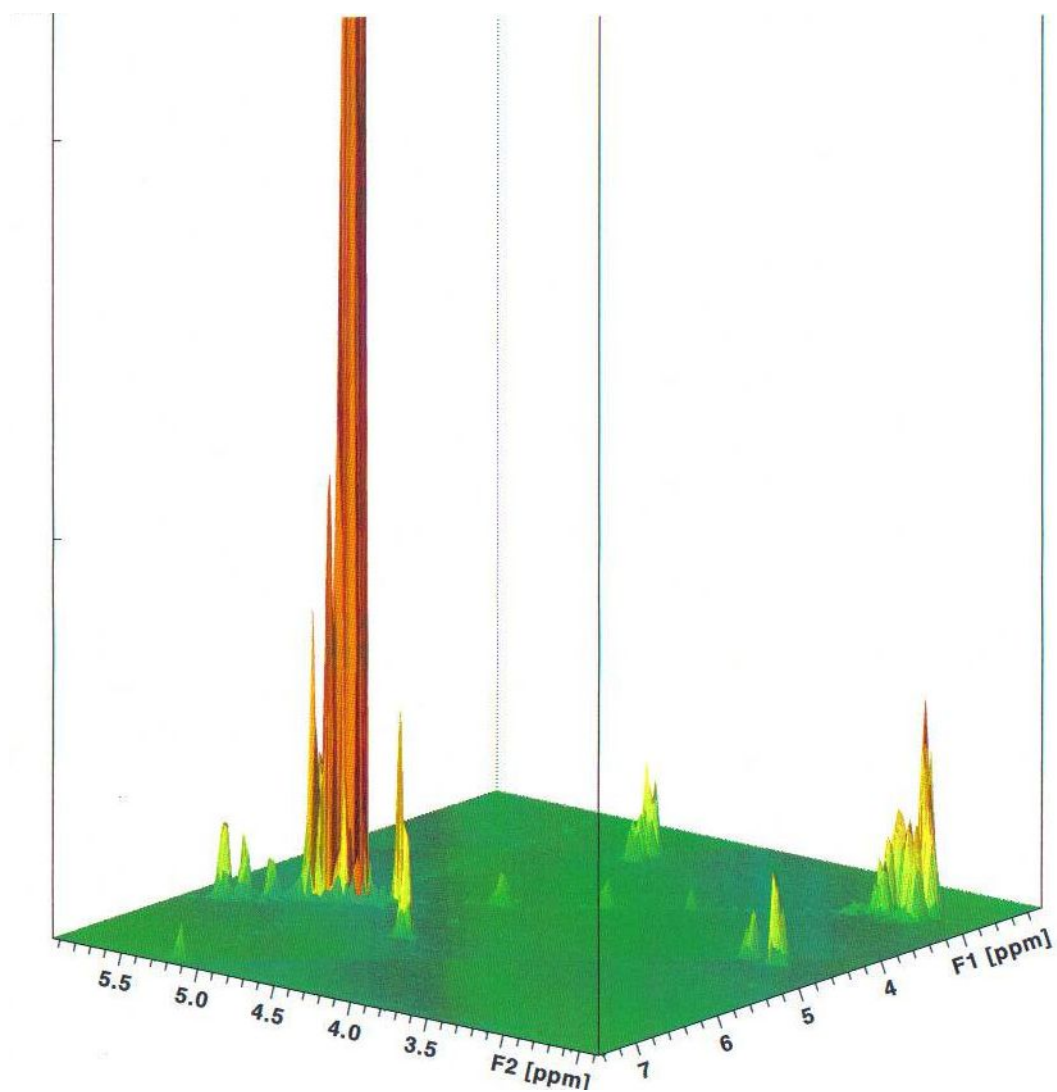


Figura A 6- Espectro COSY a três dimensões para o (S)-4-amino-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato de benzilo.

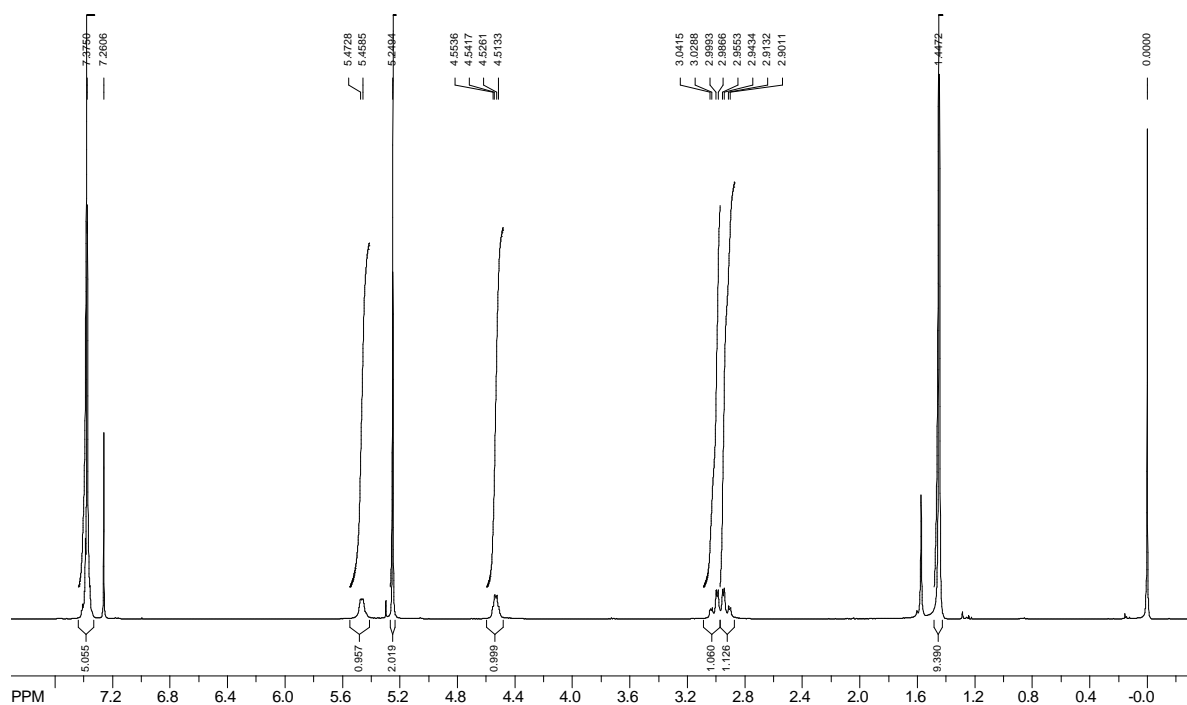


Figura A 7- Espectro de ¹H-RMN para o (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato benzilo.

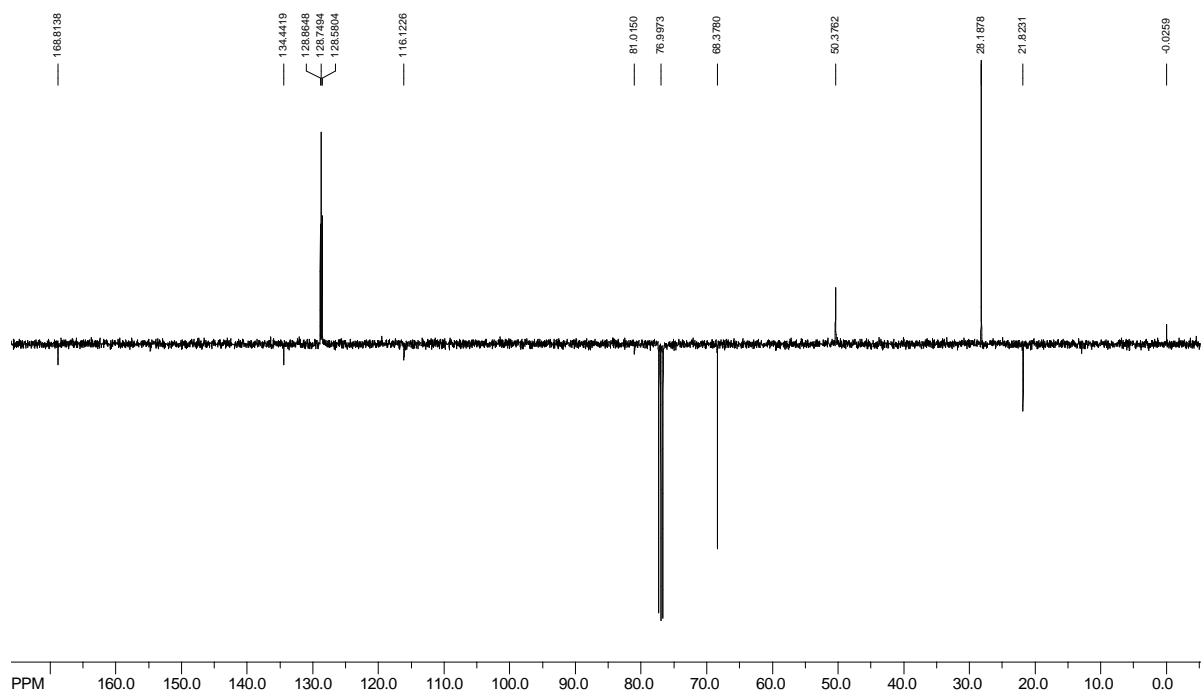


Figura A 8- Espectro de ¹³C-RMN para o (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato benzilo.

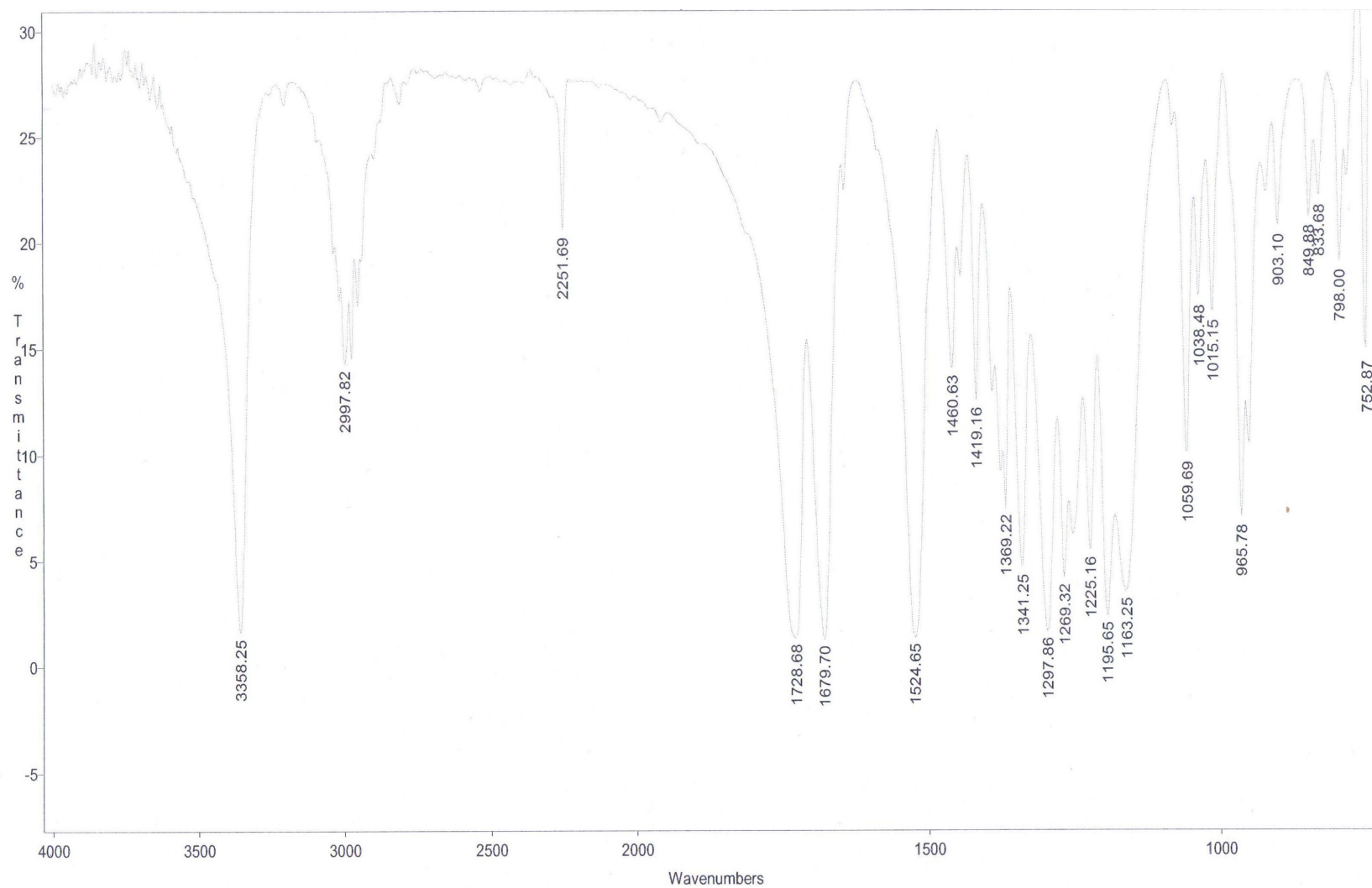


Figura A 9- Espectro de Infravermelho para o (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato benzilo.

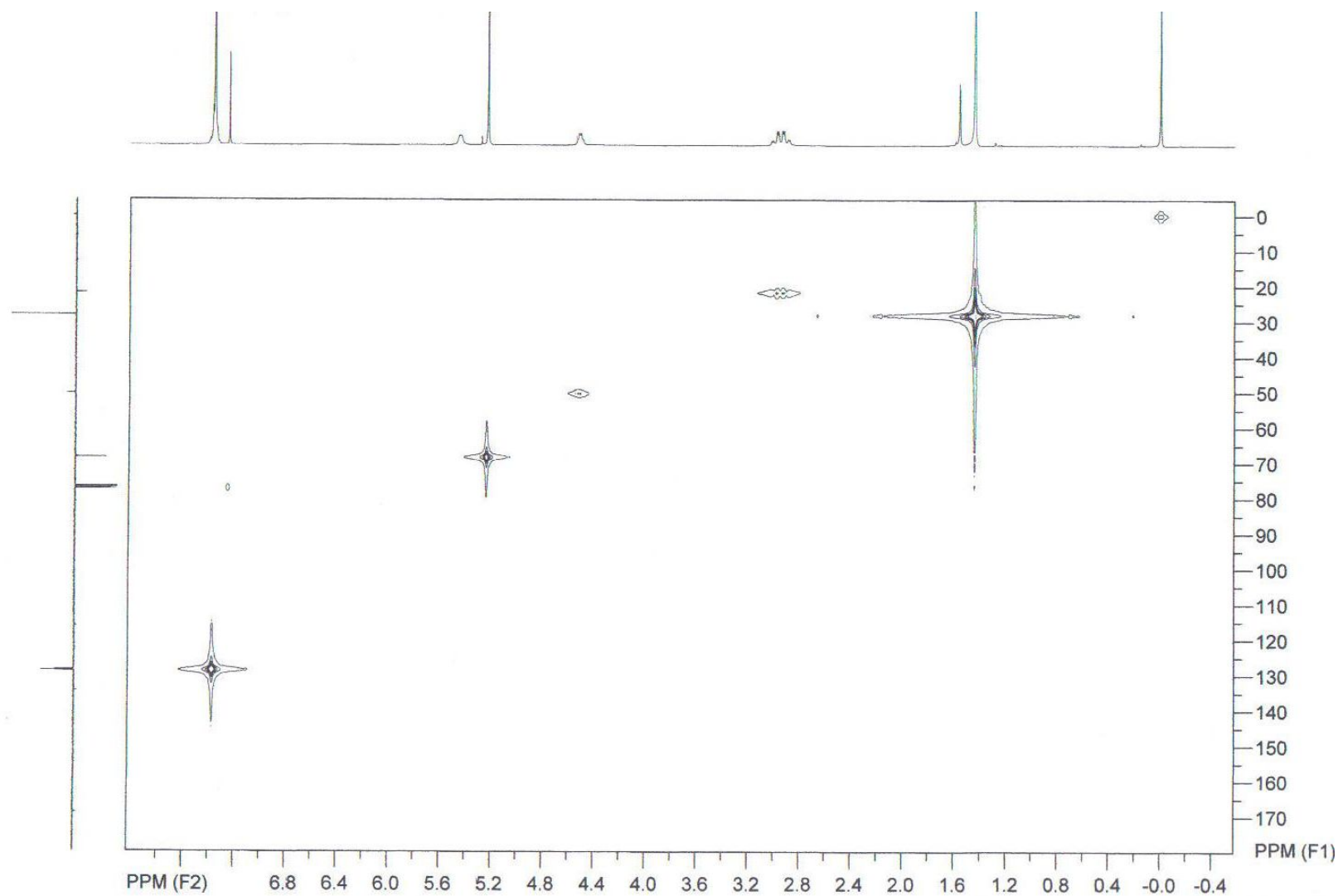


Figura A 10- Espectro HMQC para o (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato benzilo.

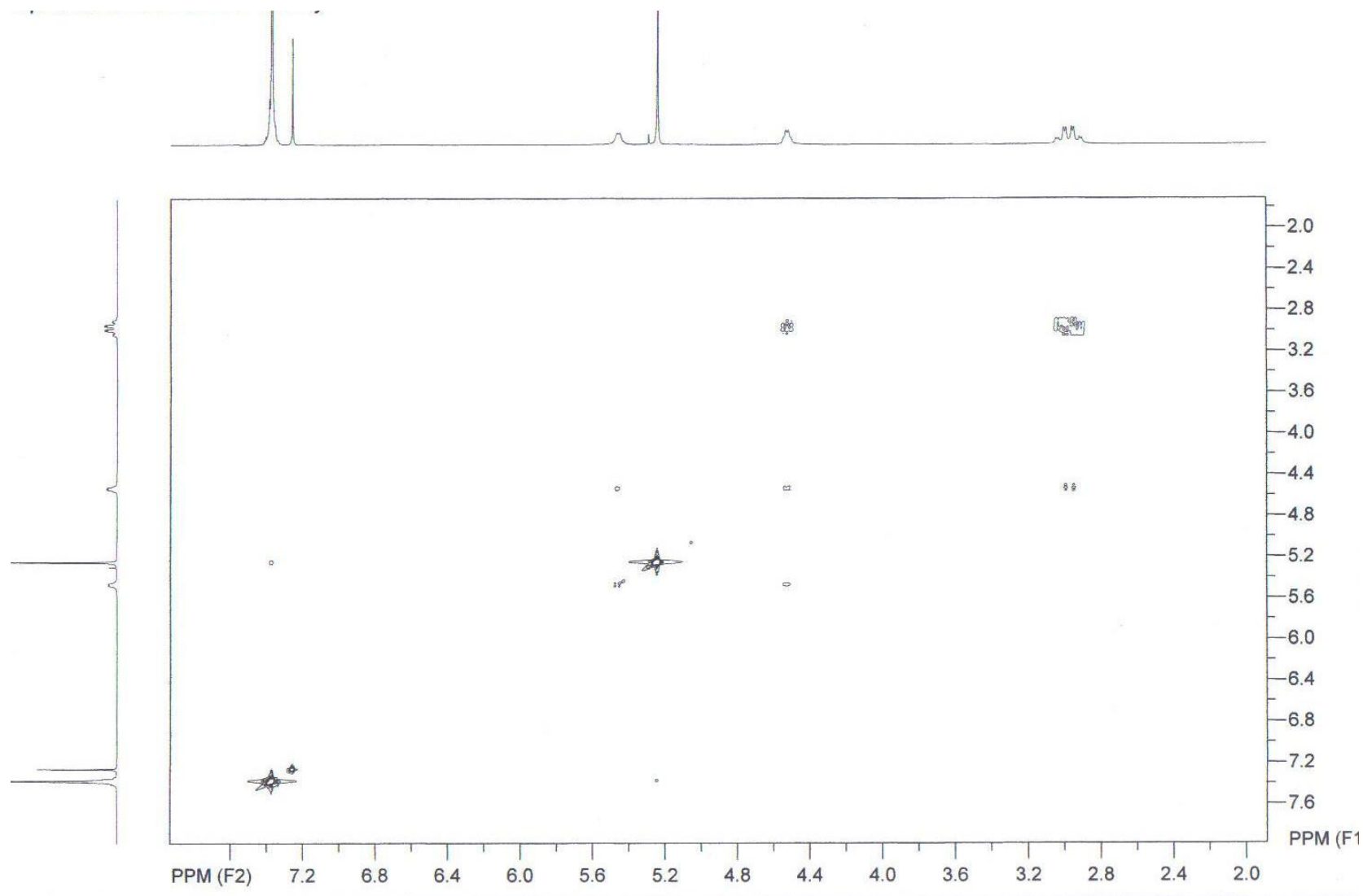


Figura A 11 - Espectro COSY para o (S)-2-(terc-butóxicarbonilamino)-3-cianopropanoato benzilo.

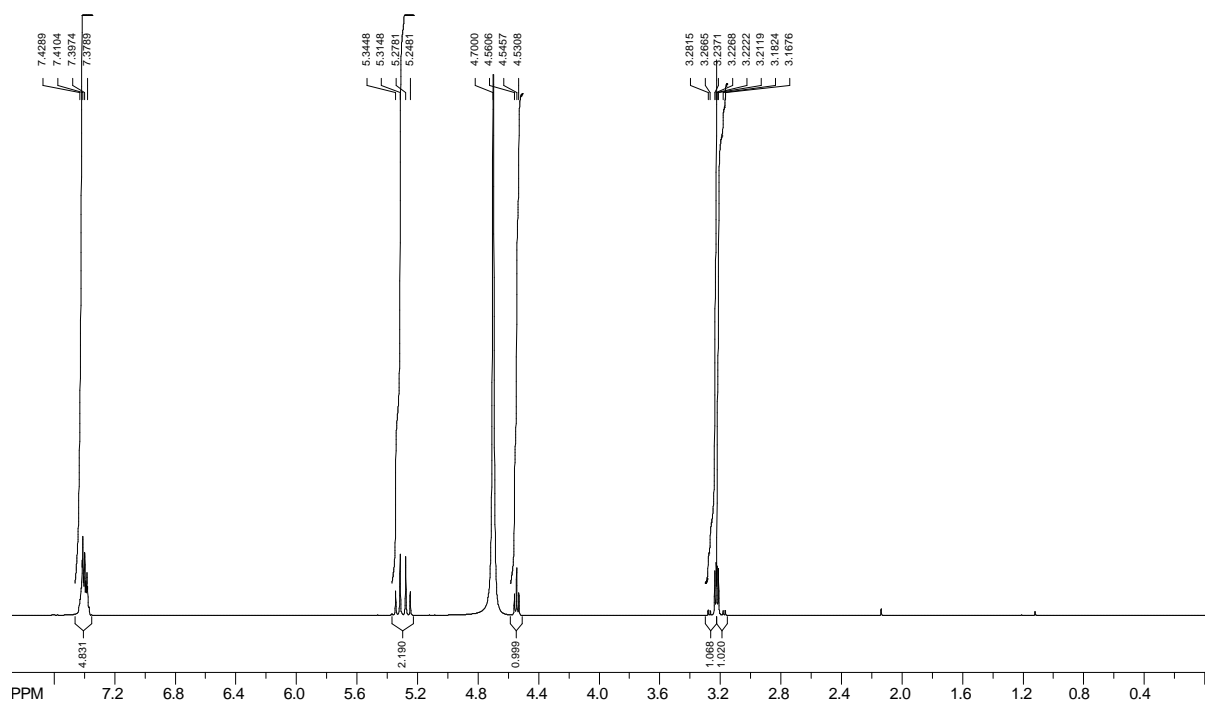


Figura A 12- Espectro de ^1H -RMN para o hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo.

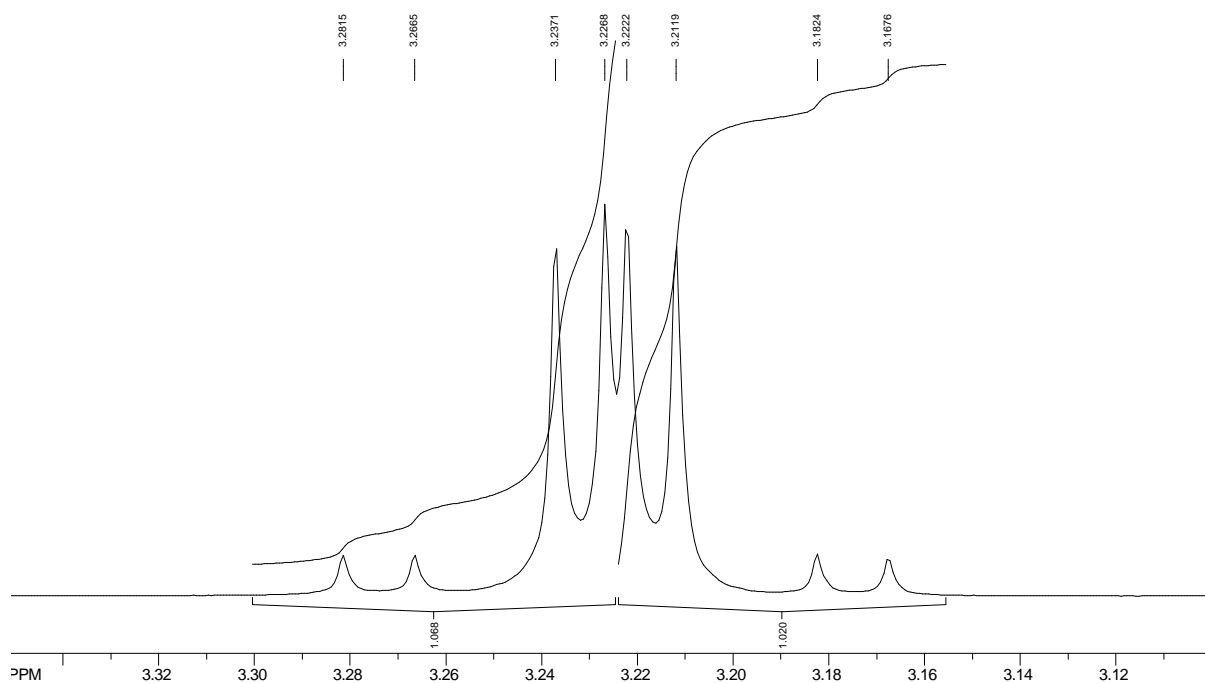


Figura A 13- Ampliação do dd dd do espectro de ^1H -RMN para o hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo.

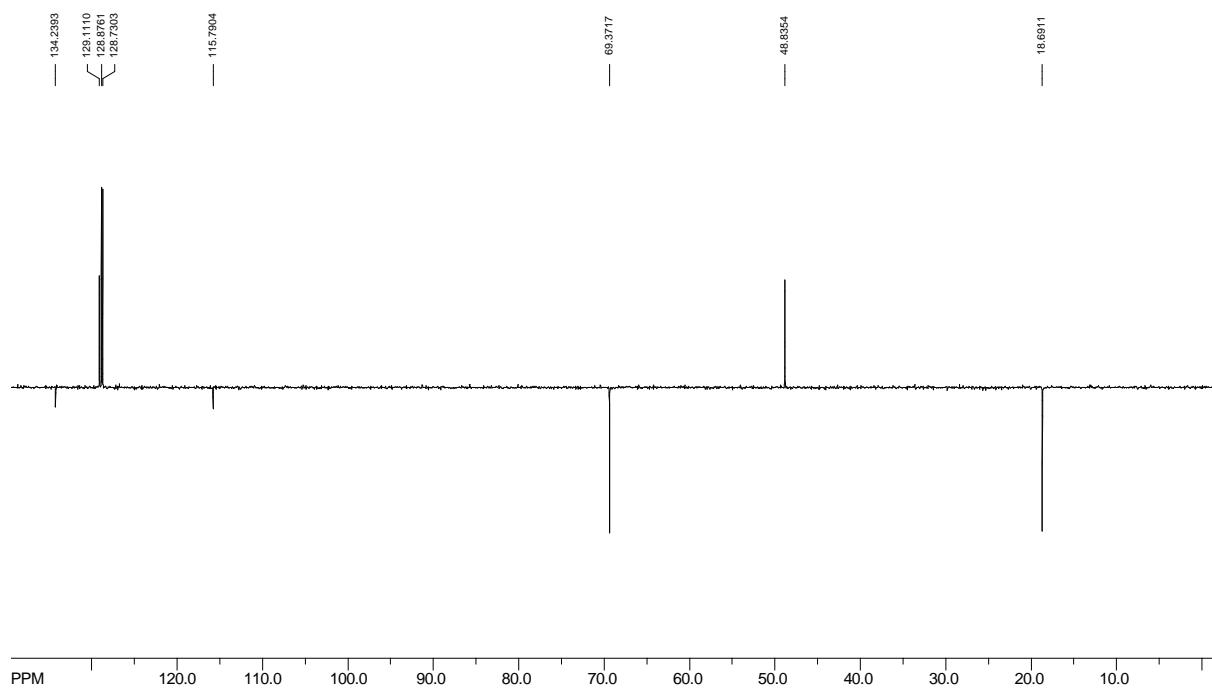


Figura A 14- Espectro de ^{13}C -RMN para o hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo.

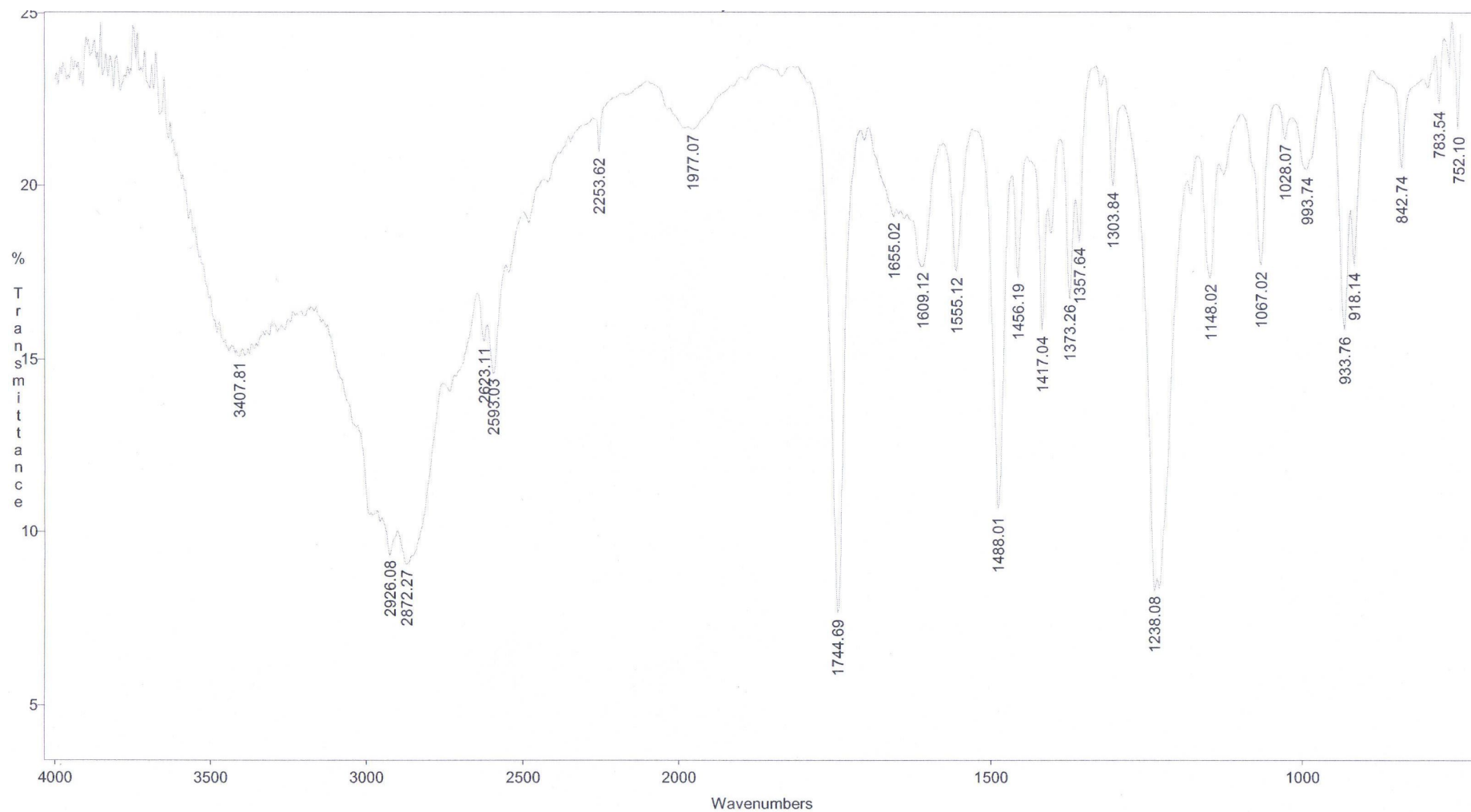


Figura A 15- Espectro de Infravermelho para o hidrocloreto de (S)-2-amino-3-cianopropanoato de benzilo.

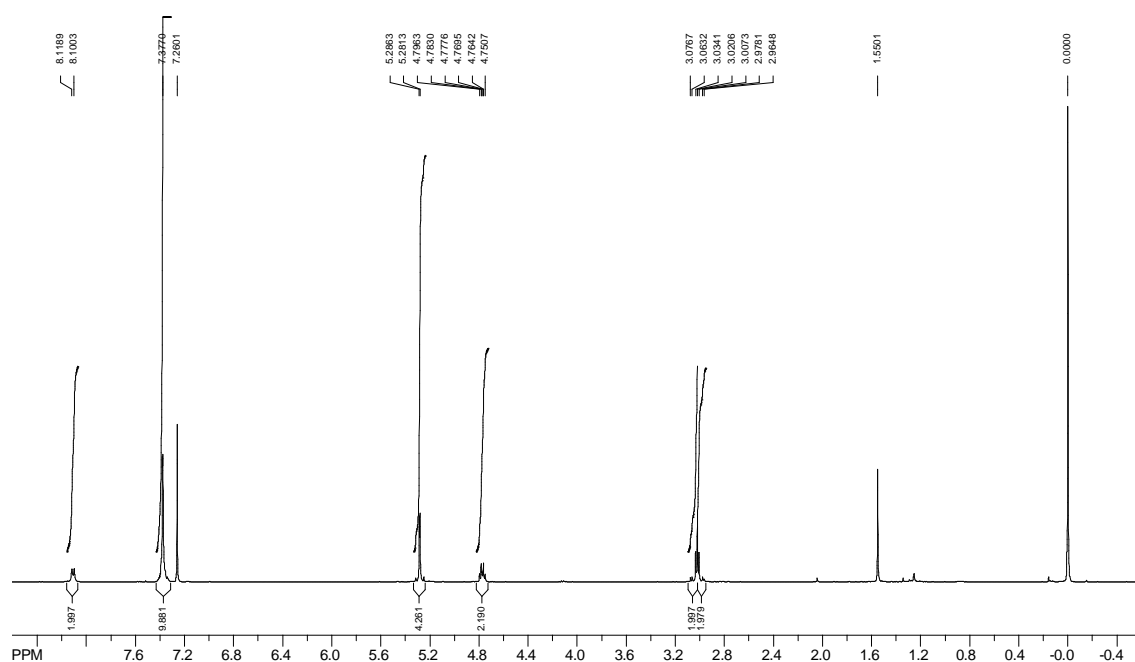


Figura A 16- Espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

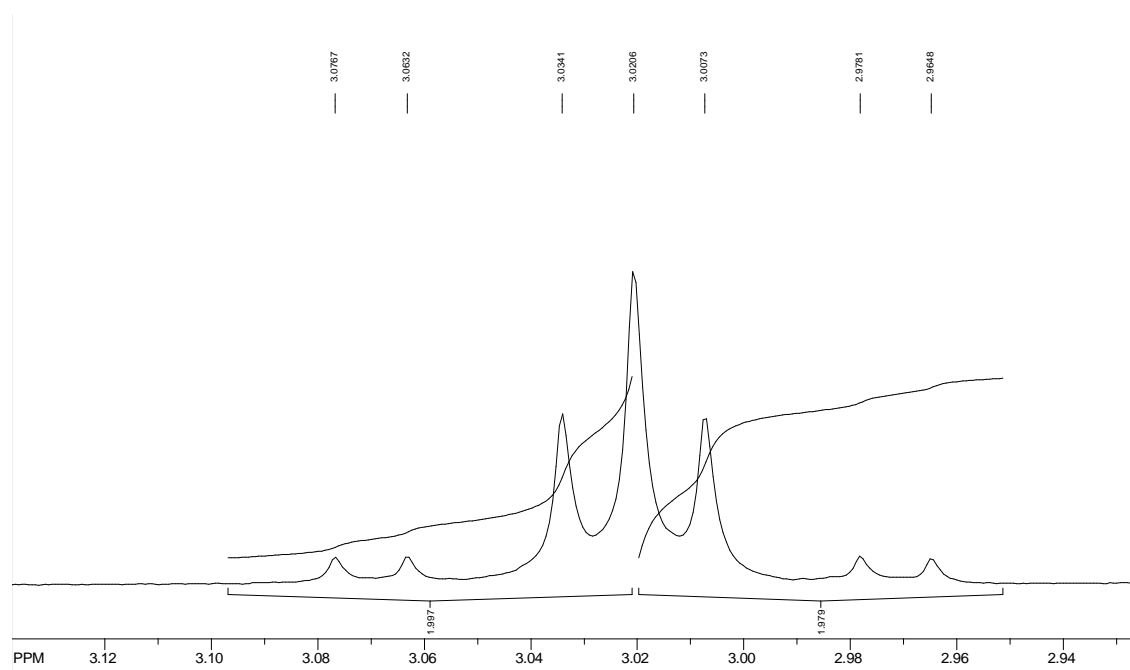


Figura A 17- Ampliação do *dd dd* do espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

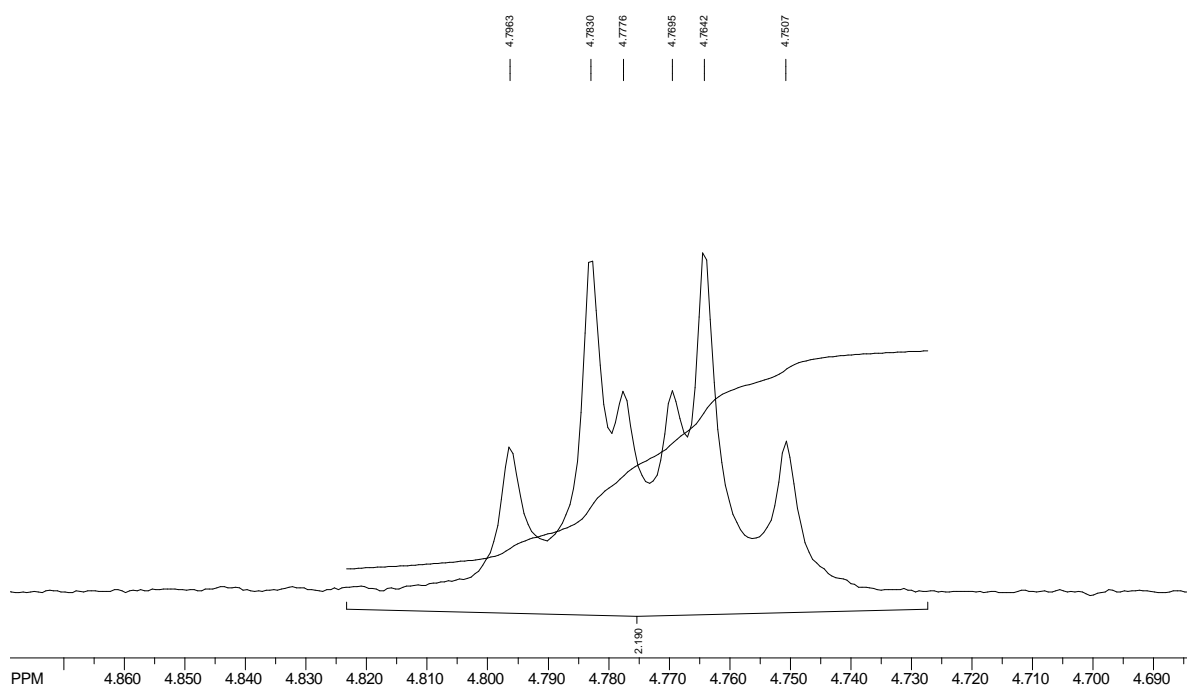


Figura A 18- Ampliação do *tt* do espectro de ^1H -RMN para (S)- etano-1,2-diona - 1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

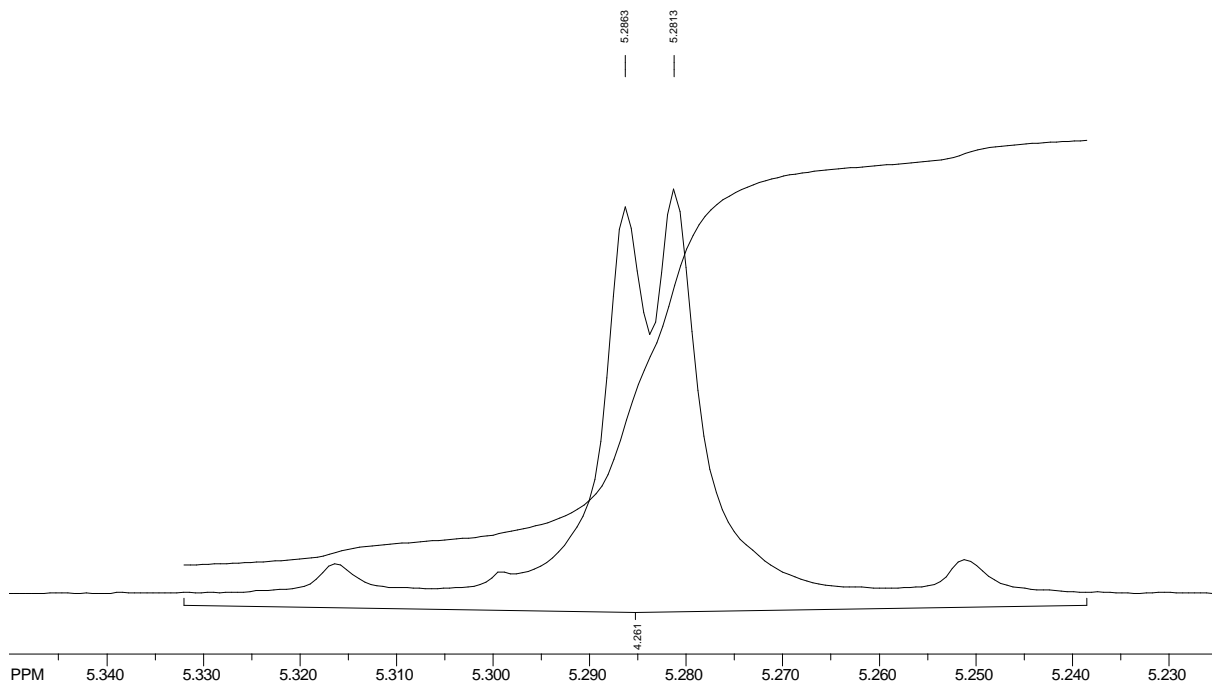


Figura A 19- Ampliação do *d* do espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-diona - 1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

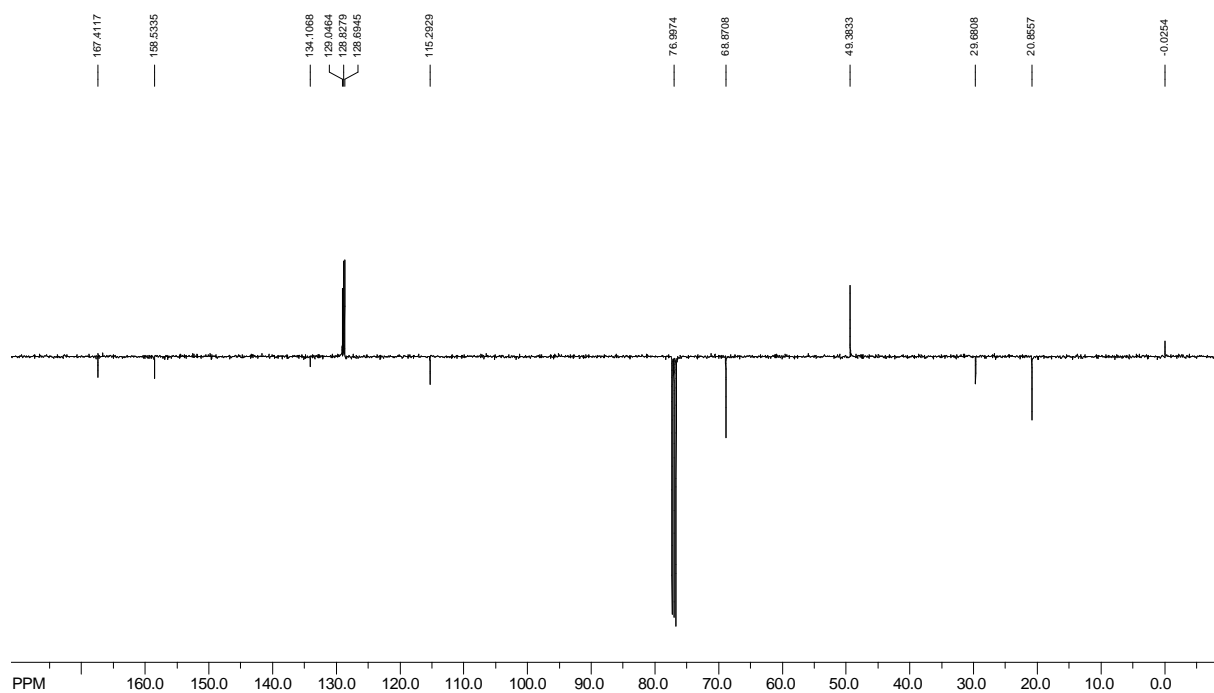


Figura A 20- Espectro de ^{13}C -RMN para o (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

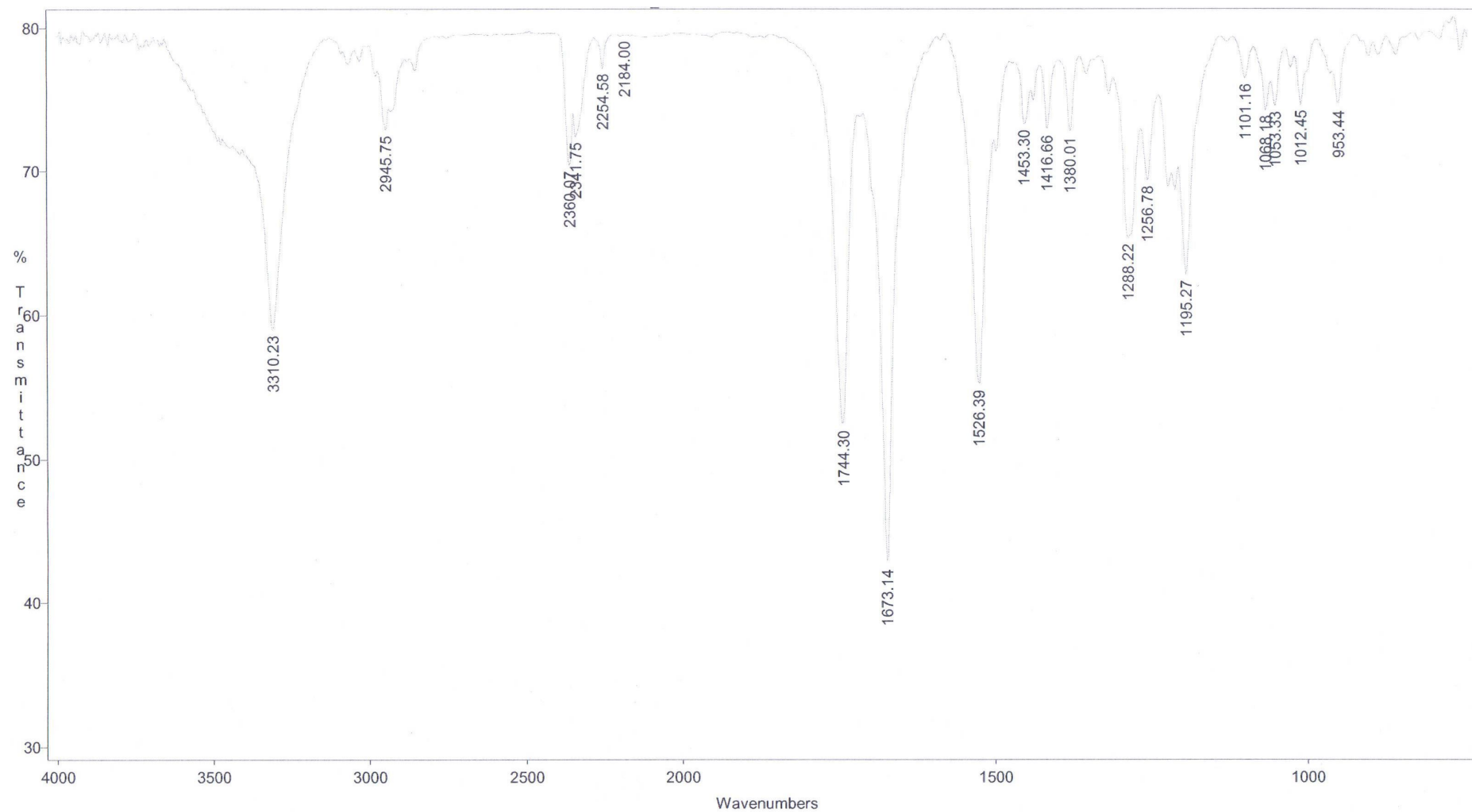


Figura A 21- Espectro de Infravermelho para o (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

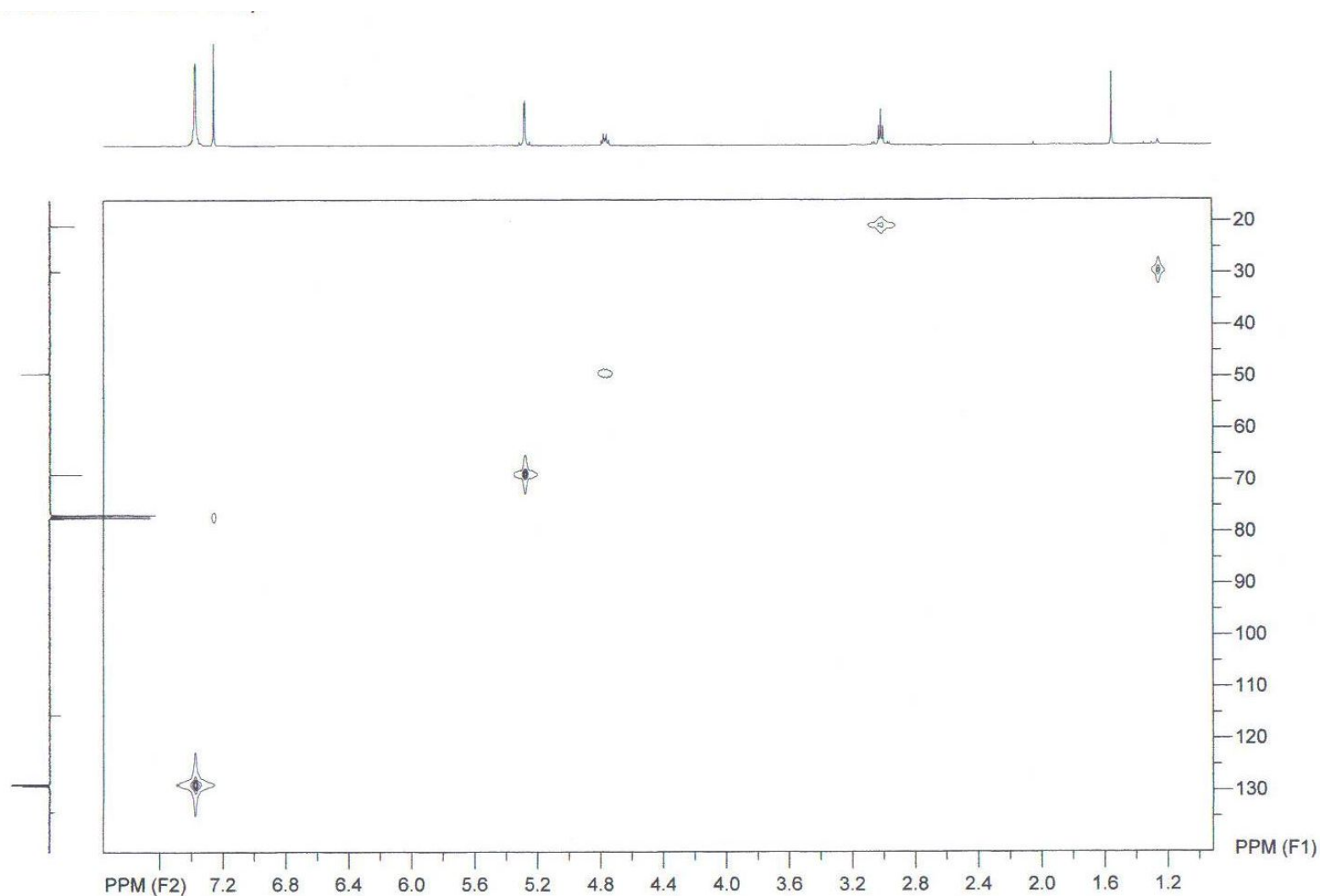


Figura A 22- Espectro de HMQC para o (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

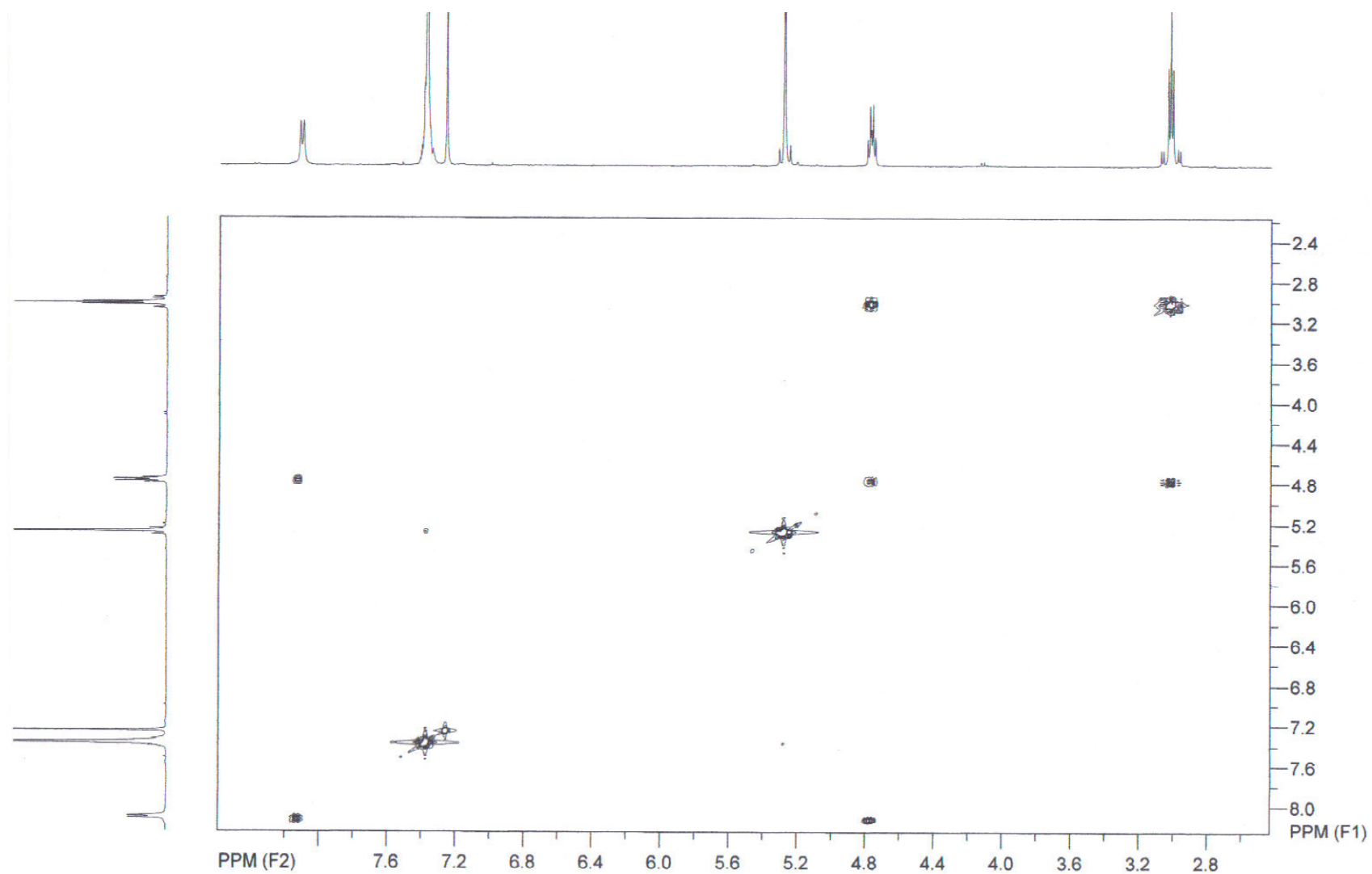


Figura A 23- Espectro de HMQC para o (S)- etano-1,2-diona -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

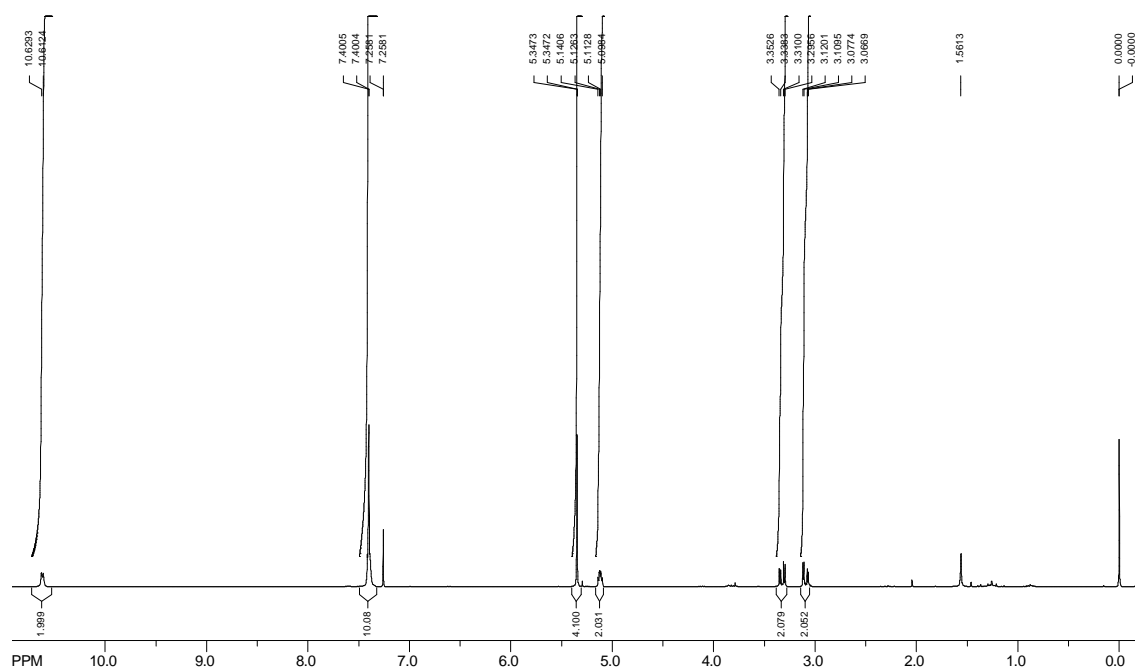


Figura A 24 - Espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

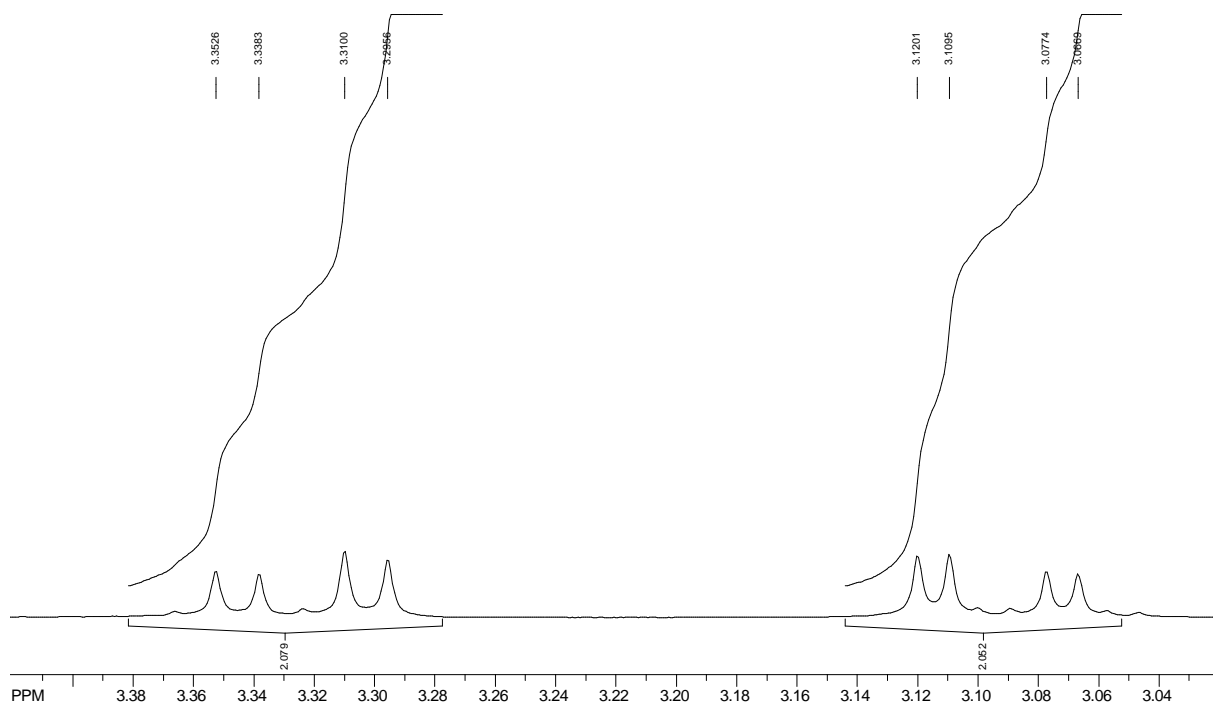


Figura A 25- Ampliação do *dd dd* do espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

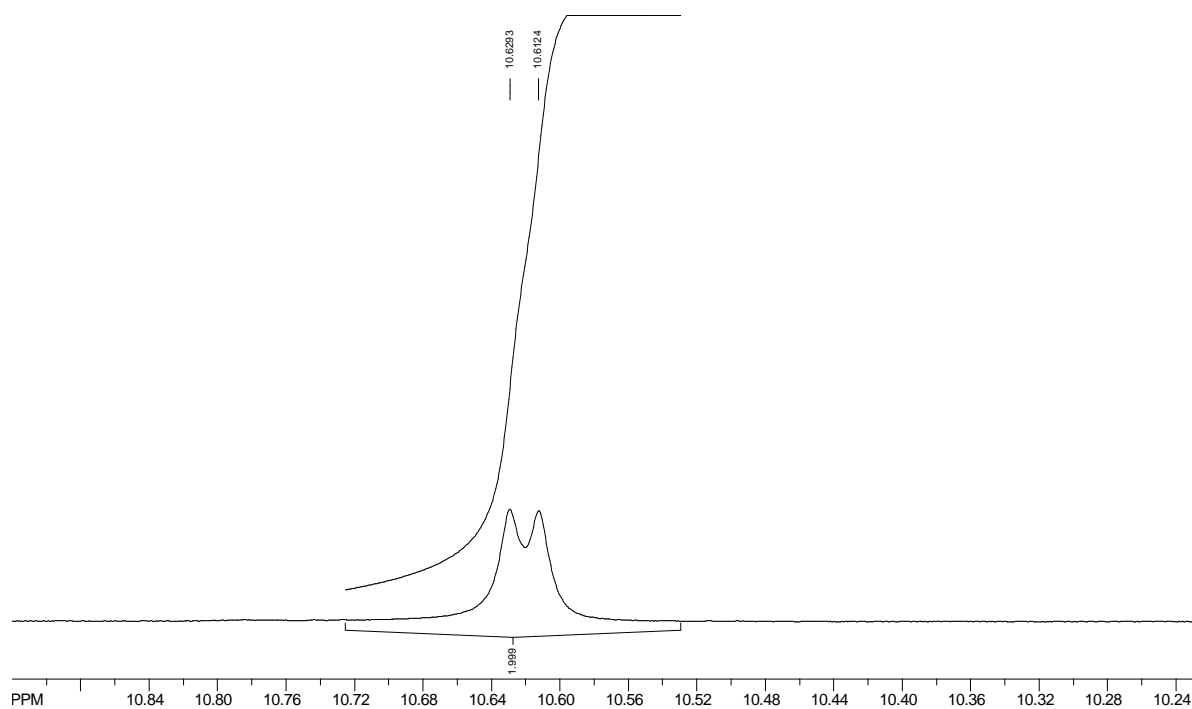


Figura A 26 - Ampliação do *d* do espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

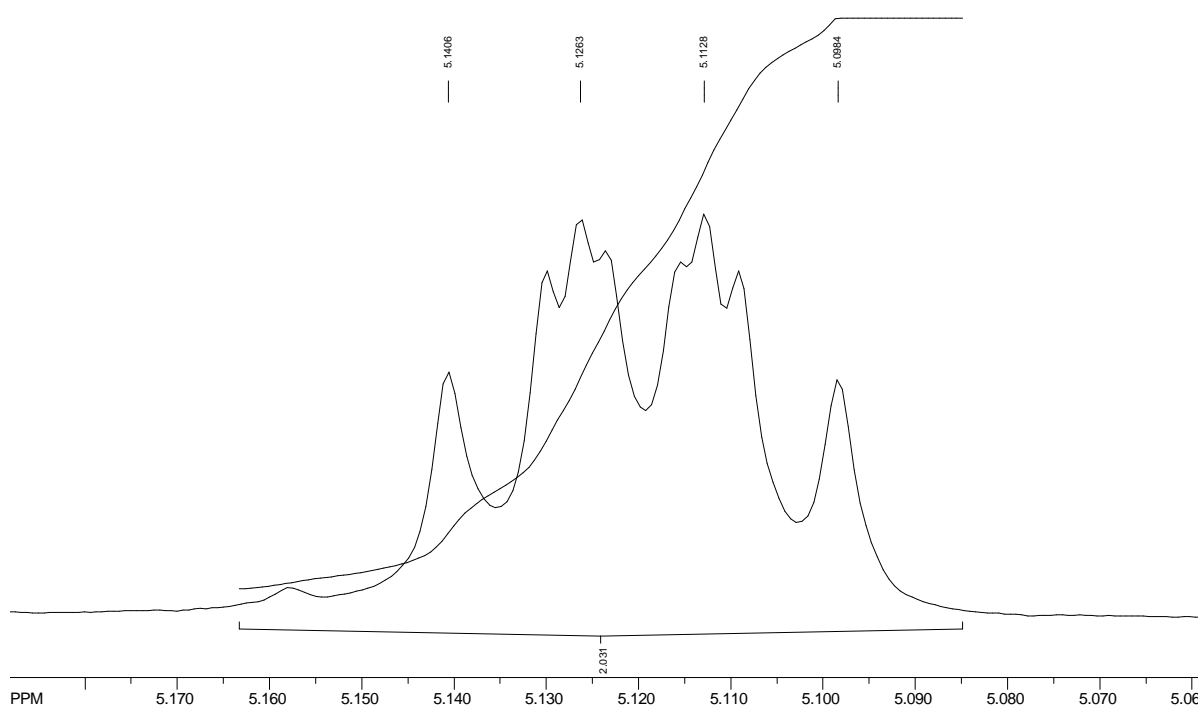


Figura A 27- Ampliação do *m* do espectro de ^1H -RMN para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

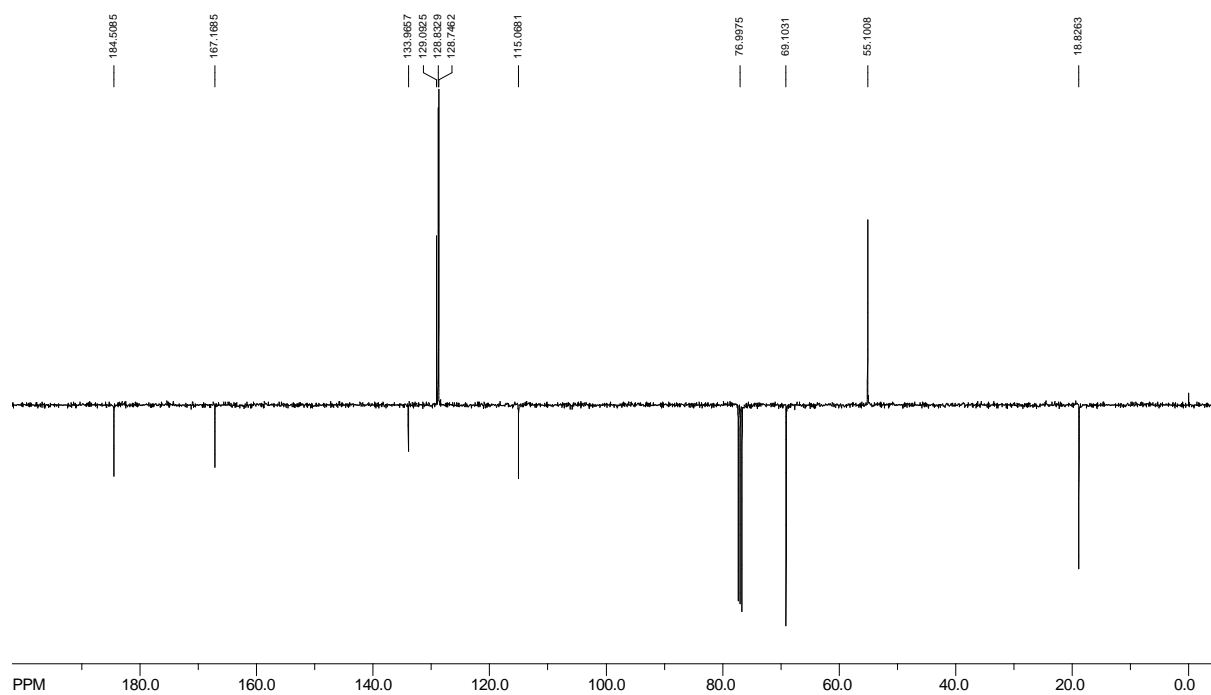


Figura A 28- Espectro de ^{13}C -RMN para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

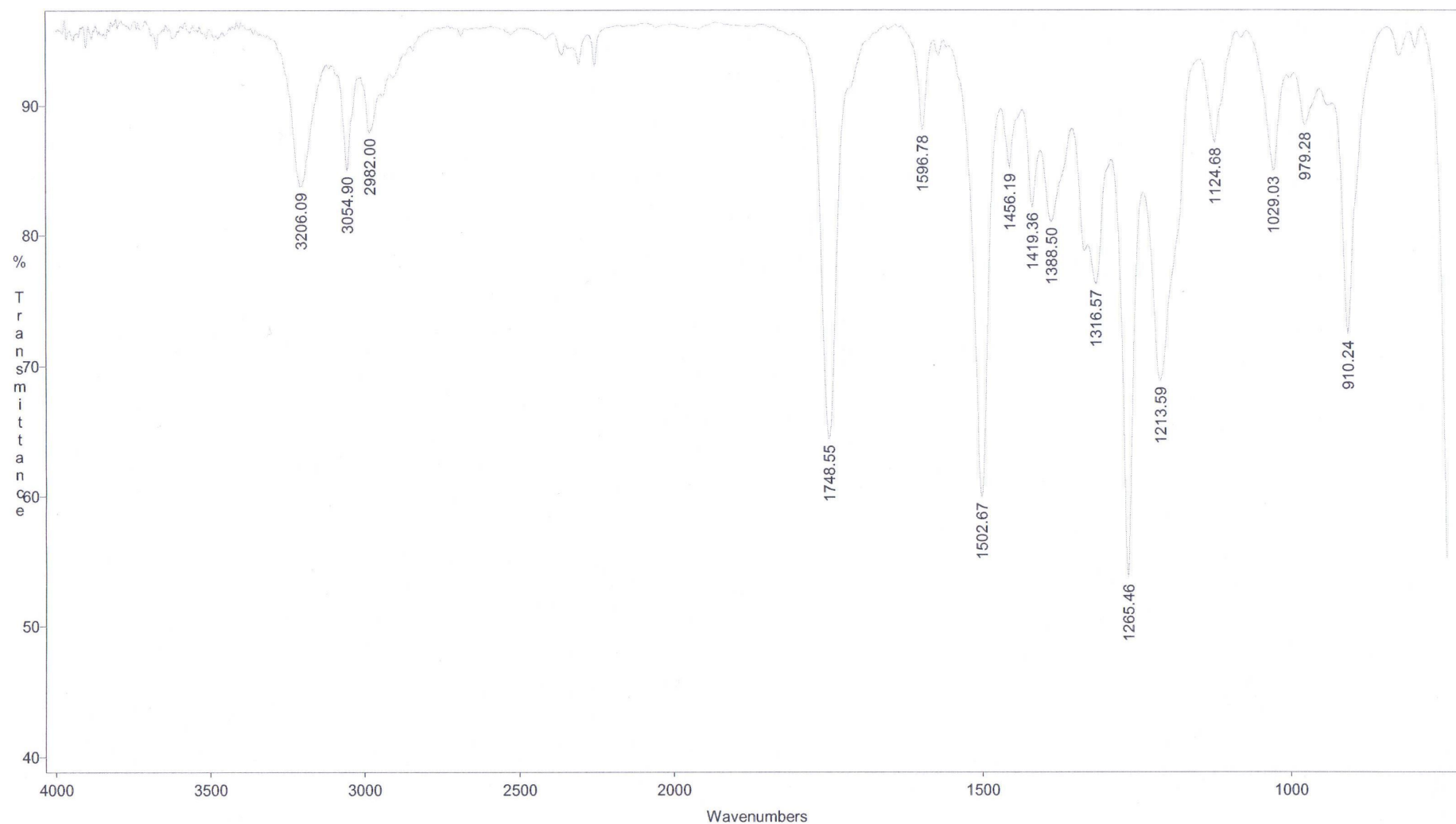


Figura A 29- Espectro de Infravermelho para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

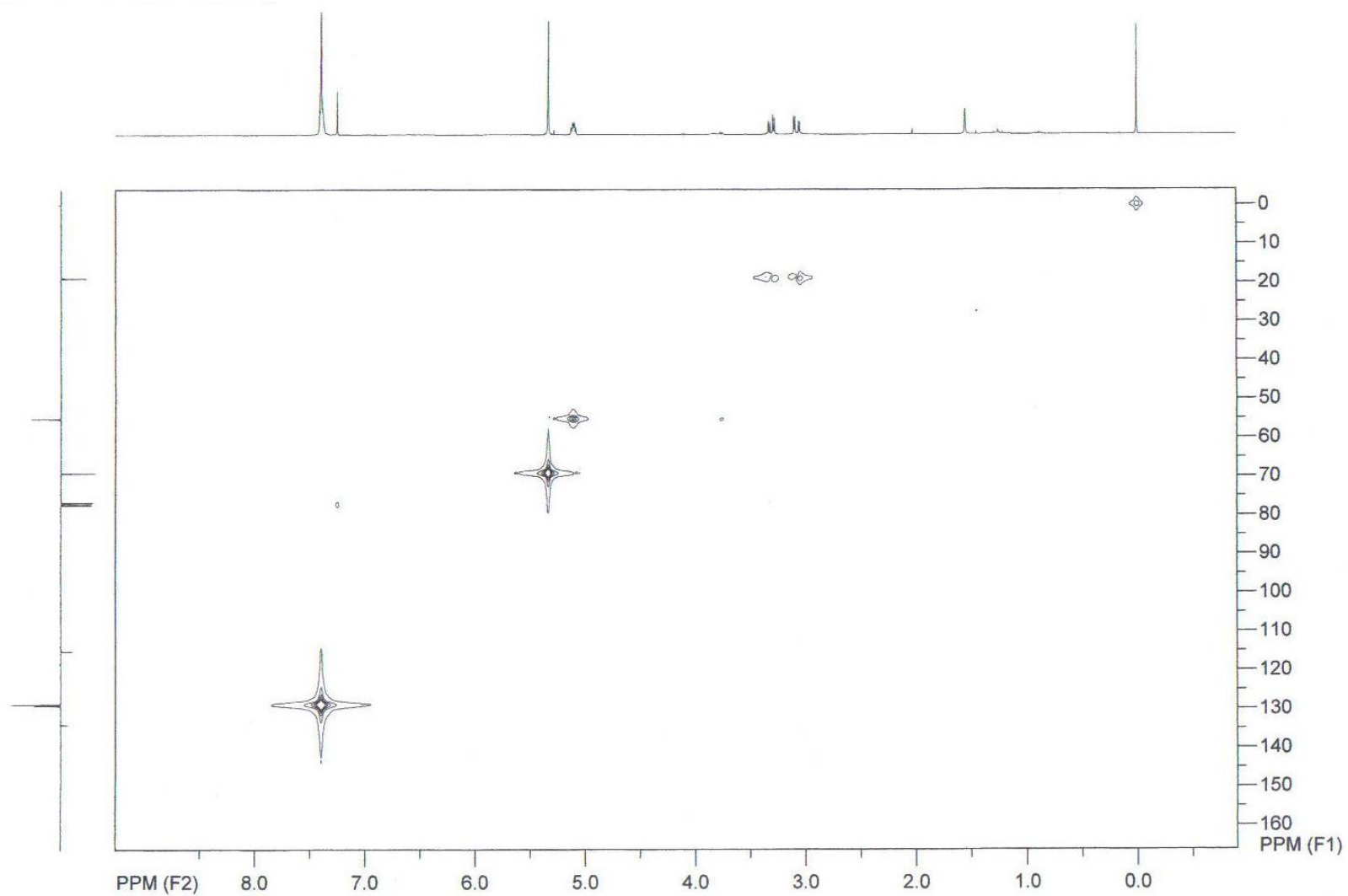


Figura A 30- Espectro HMQC para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

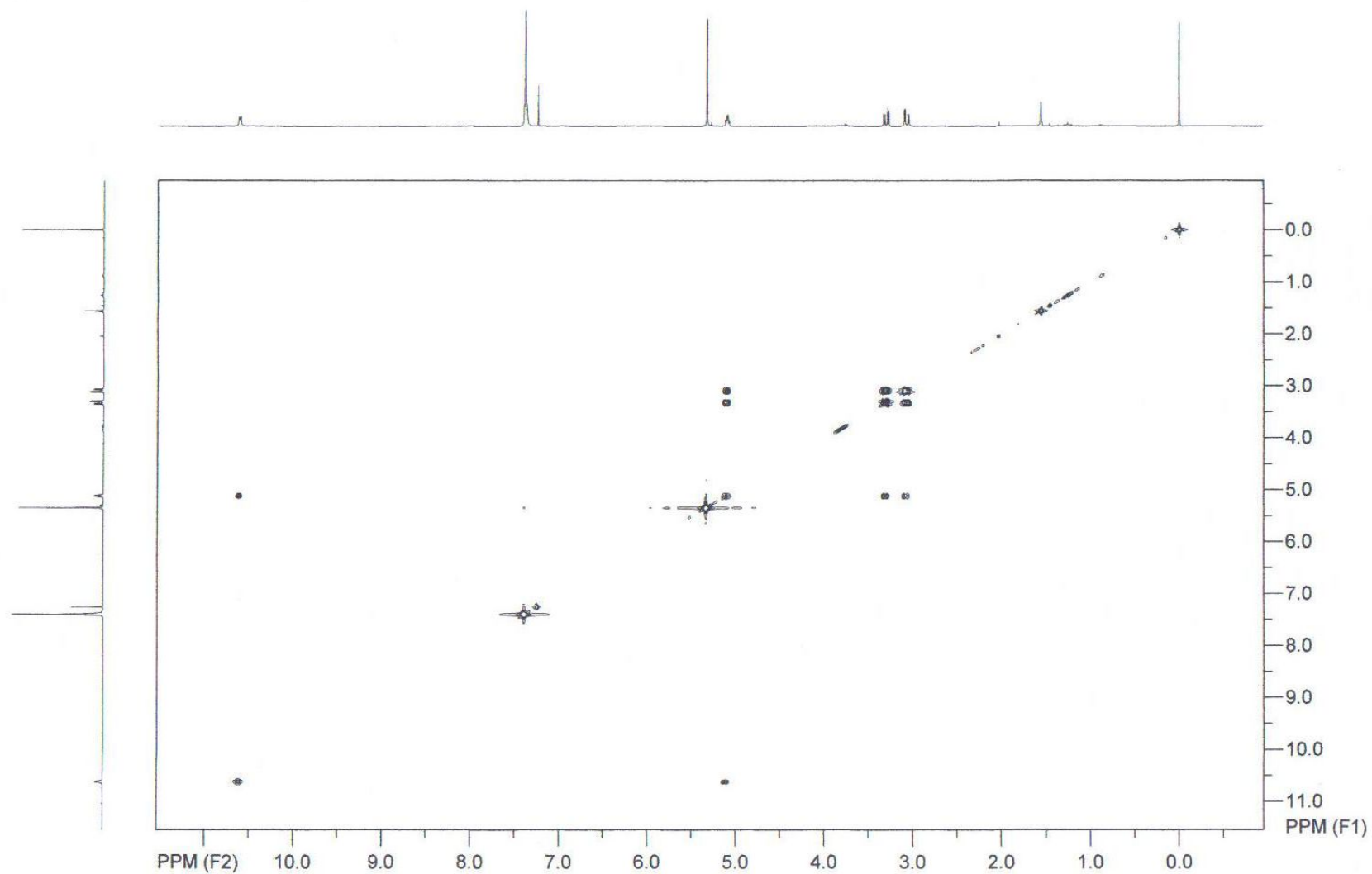


Figura A 31- Espectro COSY para o (S)- etano-1,2-ditiocarbonil -1,2bis(2-amino 3-ciano propanoato de benzilo).

